

MUTATION ET RECOMBINAISON CHEZ
DROSOPHILA HYDEI

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES
MENTION BIOLOGIQUE

PAR

Hansjörg FREI

de

Mogelsberg (St-Gall)

THÈSE N° 1768

Genève
Atelier P.V.

1977

MUTATION ET RECOMBINAISON CHEZ
DROSOPHILA HYDEI

THÈSE

PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES
MENTION BIOLOGIQUE

PAR

Hansjörg FREI

de

Mogelsberg (St-Gall)

THÈSE N° 1768

Genève
Atelier P.V.
1977

La Faculté des Sciences, sur le préavis de Messieurs H. GLOOR, professeur ordinaire et directeur de thèse, R. NÖTHIGER, professeur (Zoologisches Institut der Universität, Zürich), F.E. WÜRLER, professeur (Zoologisches Institut der Eidg. Technischen Hochschule Zürich), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 20 août 1976

Le Doyen :
Jean MULLER

Thèse N° 1768

Extraits de périodiques incorporés dans la thèse :

- Archiv für Genetik*, vol. 45, p. 99-100, 1972 (Orell Füssli Arts Graphiques SA, Zürich),
Archiv für Genetik, vol. 46, p. 63-64, 1973 (Orell Füssli Arts Graphiques SA, Zürich),
Archiv für Genetik, vol. 47, p. 136-171, 1974 (Orell Füssli Arts Graphiques SA, Zürich),
Mutation Research, vol. 24, p. 125-134, 1974 (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam),
Molecular and general Genetics, vol. 142, p. 105-117, 1975 (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York),
Drosophila Information Service, vol. 50, p. 165-166, 1973 (Department of Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon, U.S.A.).



Remerciements : Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur H. Gloor, directeur de thèse, de sa bienveillance et du soutien continu qu'il a accordé à mes travaux effectués d'abord au Genetisch Laboratorium der Rijksuniversiteit à Leyde (Pays Bas) et, dès 1970, au Laboratoire de génétique animale et végétale de l'Université de Genève. Je tiens à exprimer ma reconnaissance respectueuse à Monsieur le Professeur F.E. Würbler (Ecole Polytechnique Fédérale, Zürich) et à Monsieur le Professeur R. Nöthiger (Université de Zürich) qui ont bien voulu accepter d'être membres de mon jury de thèse. Par leur collaboration et de nombreuses suggestions Dr. H.R. Kobel, Dr. F.M.A. van Breugel (Leyde) et M. H. Beck ont contribué à ces recherches. Le docteur Ch. Thiébaud, et auparavant Mme A. Leuthold-Souré, m'ont aidé à la rédaction en français de ce texte. Mlle Liesbeth Pastors, M. B. Barandun et M. D. Brandt m'ont apporté une excellente assistance technique. C'est avec plaisir que je saisis l'occasion de les remercier pour leurs contributions tant estimées. Pour les irradiations, j'ai pu compter sur les services du Centre de Radiothérapie (Hôpital Cantonal de Genève); j'en sais gré à Monsieur le Professeur J.-P. Paunier et à Mlle M. Bernegger.

Le Fonds National Suisse de la recherche scientifique a bien voulu accorder un soutien financier à ces recherches (crédit n° 3.224.69).



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545915_0060

MUTATION ET RECOMBINAISON CHEZ DROSOPHILA HYDEI

Sommaire

Introduction	page 6
Mutagenèse dans la lignée germinale mâle	7
Quelques aspects de la mutagenèse dans les ovocytes	9
— Létalité dominante	10
— Détachement de chromosomes X attachés	10
Recombinaison intragénique et la structure fine du gène white	17
Discussion	18
Résumé	24
Bibliographie	25

Publications

- Frei H. : New **white** alleles by recombination in **Drosophila hydei**.
Drosophila Information Service **50**, 165-166 (1973).
- Frei H. : Röntgeninduktion geschlechtsgekoppelter rezessiver Letalfaktoren und Mutationsrate bei **Drosophila hydei**.
Archiv für Genetik **45**, 99-100 (1972). Abstract.
- Frei H. : Strahlenempfindlichkeit der meiotischen Prophase-Stadien in der Oogenese von **Drosophila hydei**.
Archiv für Genetik **46**, 63-64 (1973). Abstract.
- Frei H. : Radiation-induced dominant lethality in oocytes of **Drosophila hydei**, with emphasis on the differential sensitivity of the immature stages in class B.
Mutation Res. **24**, 125-134 (1974).
- Frei H. : Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der Spermatogenese von **Drosophila hydei**, Letalraten und die Bedeutung der arteigenen genetischen Organisation.
Archiv für Genetik **47**, 136-171 (1974).
- Frei H. : Intragenic recombination at the **white** locus of **Drosophila hydei**.
Molec. gen. Genet. **142**, 105-117 (1975).

INTRODUCTION

Les recherches de génétique comparative portant sur les espèces du genre *Drosophila* ont montré qu'à l'intérieur d'une telle parenté les divergences génétiques sont limitées (Gregg et Smucker 1965, Spencer 1949, 1957, Sturtevant et Novitski 1941). Une bonne partie des mutations, affectant par exemple la morphogenèse, fait apparaître un parallélisme de manifestations remarquable, si bien que l'exemple des drosophiles passe pour une des meilleures preuves à l'appui de la Loi de Vavilov (Hadorn 1955). Il est néanmoins évident que le genre, comprenant quelques 1 200 espèces (Laird 1973), n'est nullement uniforme, mais qu'il présente au contraire un éventail de différences interspécifiques à plusieurs niveaux de l'organisation génétique. Il suffira, ici, de mentionner qu'il existe des différences énormes de taille et de pigmentation, ainsi que des différences écologiques remarquables (espèces aux larves monophages, aquatiques et carnivores même!), et en même temps des différences non négligeables concernant le contenu en ADN, les propriétés de l'ADN satellite, la fréquence du crossing-over, le caryotype et l'ordre des gènes sur les chromosomes (Buzzati-Traverso et Scossiroli 1955, Laird 1973, Patterson et Stone 1952, Perje 1955, Spurway 1945, Wasserman 1962 a-d).

A titre d'exemple, *D. melanogaster* et *D. hydei* se distinguent par un nombre inégal de chromosomes, bien que le "Nombre Fondamental" semble identique, du moins en ce qui concerne les éléments euchromatiques (Heitz 1933, Spencer 1949). L'hétérochromatine est présente dans les régions centriques chez les deux espèces, mais une grande partie est liée aux chromosomes sexuels X et Y. Son arrangement sur le chromosome X est particulièrement différent entre ces deux espèces (van Breugel 1970, Cooper 1959, Heitz 1933). Une autre différence concerne le chromosome Y qui possède deux organisateurs nucléolaires chez *D. hydei* (Hennig, Link et Leoncini 1975, Meyer et Hennig 1974, Schäfer et Kunz 1975), et un seul organisateur chez *D. melanogaster* (Cooper 1959).

Ajoutons que les espèces de *Drosophila* montrent des variations substantielles dans le contenu en ADN par génome haploïde (Laird 1973): *D. virilis* et *D. funebris* en possèdent à peu près le double de *D. melanogaster*, *D. hydei* se trouvant dans une position intermédiaire. Evidemment, les quantités en ADN total pourraient largement dépendre de l'ADN satellite à séquences hautement répétitives dont on ignore toujours le rôle fonctionnel. Mais — coïncidences peut-être — la longueur des cartes génétiques du chromosome X indique des taux élevés de crossing-over chez *D. virilis* (Chino 1936) et *D. funebris* (Perje 1955) par rapport à *D. melanogaster*. Chez *D. hydei*, ce taux se situe entre les deux extrêmes (Spencer 1949). Bien entendu, la différence en longueur des cartes de recombinaison des chromosomes X (70 unités chez *D. melanogaster* et environ 116 unités chez *D. hydei*) pourrait tirer son origine d'une diversité dans le système enzymatique responsable des échanges génétiques. Elle pourrait aussi refléter une inégalité de la dimension physique

des chromosomes, voire du nombre de gènes contenus dans les chromosomes. Pour deux espèces si peu apparentées que *D. hydei* et *D. melanogaster*, qui appartiennent à deux sous-genres différents (Patterson et Stone 1952, Throckmorton 1962), la dernière hypothèse n'est pas réfutable d'emblée, puisque l'arrangement des gènes et les séquences des bandes chromomériques des chromosomes géants sont si divers qu'ils rendent impossible une comparaison directe des chromosomes des deux espèces, sauf pour certaines petites régions bien définies (van Breugel, Ray et Gloor 1968, Spencer 1949). Au sujet du nombre de gènes intégrés dans le génome des drosophiles, on est frappé par le fait que certaines espèces de Hawaï montrent dans les chromosomes polytènes des duplications ou des "repeats" multiples qui peuvent atteindre une étendue considérable (Yoon et Wheeler 1973). D'autre part, la gamme de mutations connues sur le chromosome X de *D. hydei* (Kobel et Gloor 1971, Spencer 1949) montre un parallélisme plus que fortuit par rapport à *D. melanogaster* et à d'autres espèces (Chino 1936, Perje 1955, Spencer 1957, Spurway 1945, Sturtevant et Novitski 1941). Par là, il semble tout à fait concevable que l'information génétique contenue dans les différents chromosomes ou bras de chromosomes homologues soit en général équivalente d'une espèce à l'autre.

Les recherches qui seront résumées ci-après ont trait à la génétique de *D. hydei*. Elles ont pour but de contribuer à la compréhension de l'organisation génétique chez les espèces de *Drosophila*. Les aspects de mutagenèse sont spécialement considérés puisqu'il est bien possible que les changements mutationnels dépendent pour leur réalisation des particularités structurales de l'organisation du génome. L'analyse, par recombinaison intragénique, de la structure fine du gène *white* a de l'attrait parce qu'il s'agit d'un gène incontestablement homologue découvert par des mutations parallèles dans bien d'espèces du genre *Drosophila* (Chino 1936, Perje 1955, Spencer 1949, 1957, Spurway 1945, Sturtevant et Novitski 1941). Les différences à plusieurs niveaux de l'organisation génétique entre les espèces de *Drosophila* incitent à nous poser la question de savoir si de tels gènes homologues ont maintenu ou altéré leur organisation interne au cours des adaptations génétiques qui marquent l'évolution d'un groupe d'espèces.

MUTAGENÈSE DANS LA LIGNÉE GERMINALE MÂLE

Par voie indirecte et en se basant sur le taux de mutations létales provoquées, Lea (1946) a estimé le nombre de gènes contenus dans le chromosome X de *D. melanogaster*. En admettant que la fréquence des mutations induites est proportionnelle au nombre de gènes d'un chromosome (cf. Rudkin 1965), il me semblait intéressant de déterminer le taux des mutations létales produites sur le chromosome X de *D. hydei* par différentes doses de rayons X. Pour une comparaison entre espèces de ce paramètre de mutabilité, il était pourtant essentiel de baser

l'évaluation sur un matériel cellulaire équivalent. Il était donc nécessaire de tenir compte de la sensibilité très variable des cellules soumises aux irradiations. Chez *D. melanogaster*, des informations très complètes existent sur la sensibilité différentielle des cellules de la spermatogenèse (Sävhaugen 1963, Sobels 1965, Traut 1963). Les méthodes courantes de fractionnement des cellules germinales mâles (Auerbach 1954) ont été adaptées à *D. hydei*. De cette manière, il a été possible de suivre l'action mutagénique des rayons X sur les différents stades de la spermatogenèse. Il s'est avéré que le développement des spermatozoïdes chez *D. hydei* est deux fois plus long que chez *D. melanogaster*. La durée des stades successifs semble proportionnellement prolongée. L'analyse de la chronologie de la spermatogenèse chez *D. hydei* a été facilitée par le fait que chez les deux espèces l'irradiation produit des effets génétiques similaires et suffisamment spécifiques aux divers stades.

Pour *D. hydei*, une méthode a été développée suivant le principe de la technique "CIB", telle qu'elle avait été conçue par Muller (1928 a,b) pour *D. melanogaster*. Le nouveau test a permis d'identifier les mutations récessives-létales liées au chromosome X de *D. hydei*. Celles-ci sont produites à un taux moyen de $2,3 \cdot 10^{-2}$ par 1 000 Röntgen dans la catégorie de cellules comprenant les spermatozoïdes submaturs et les spermatides avancés. La valeur obtenue se réfère à des expériences d'irradiation dont les doses s'échelonnaient entre 1,5 et 12 kR. Entre *D. melanogaster* et *D. hydei*, il ne semble pas y avoir de différence significative dans le taux d'induction de mutations létales. Il y a bien des raisons (Frei 1974 b) pour admettre que chez d'autres espèces, telles que *D. funebris* (Keller et Lüers 1937) et *D. subobscura* (Christie 1939), cette mutabilité soit du même ordre.

Si la fréquence d'induction de mutations récessives-létales n'a apparemment pas de rapports directs avec les différences existantes entre les espèces mentionnées en ce qui concerne l'architecture des chromosomes (Cooper 1959, Hauschteck-Jungen, Jungen et Müller 1972, Heitz 1933), il se pourrait cependant que d'autres formes de mutations en dépendent plus sensiblement. L'architecture des chromosomes X étant bien différente chez *D. melanogaster* et *D. hydei*, il semble raisonnable d'y attribuer deux phénomènes qui apparaissaient avec netteté dans les expériences menées avec *D. hydei* :

1° — Après irradiation des mâles, la progéniture de première génération contenait en général plus de mâles que de femelles par rapport au contrôle. L'effet dépend de la dose appliquée et il est le plus accentué pour les doses élevées. Il est tout à fait possible que le phénomène soit dû à une catégorie de mutations dominantes-létales liées aux chromosomes sexuels. Ces mutations, induites pendant la spermiogenèse, amènent donc une mortalité plus marquée chez les femelles de la progéniture engendrée. Apparemment, un tel déséquilibre dans la proportion des sexes se réalise de manière plus prompte chez *D. hydei* et *D. pseudoobscura* (Morgan, Bridges et Schultz 1930, Schultz 1933) que chez *D. melanogaster* (Bauer 1939, Leuthold 1972). En supposant que ces différences soient attribuables à des particularités de l'organisation génétique, il est intéressant de noter qu'en effet les chromosomes X de *D. hydei* (Heitz 1933) et de *D. pseudoobscura* (Buzzati-Traverso et Scossiroli 1955) sont relativement grands aussi bien par rapport au chromosome Y que par rapport à l'ensemble des chromosomes. Contrairement à *D. melanogaster* (Cooper 1959),

l'inégalité des chromosomes X et Y est nette chez *D. hydei*. En admettant que chez cette espèce le volume respectif des chromosomes X et Y est déterminant pour la létalité différente entre les progénitures de sexe opposé, nous nous allions à Lindsley, Edington et von Halle (1958) et à Leuthold (1972) qui ont constaté chez *D. melanogaster* une corrélation positive entre la létalité induite et la quantité de matériel chromosomique irradié.

2° — Les stades précoces de la spermatogenèse chez *D. hydei* se sont montrés sensibles à l'induction par irradiation de délétions de l'organisateur nucléolaire du chromosome X. A la première génération, cette perte se manifestait chez les femelles par une pseudo-dominance extrême de la mutation *bobbed* qui était présente sur le chromosome X non-irradié. La position pré-terminale de l'organisateur nucléolaire sur le bras hétérochromatique du chromosome X, métacentrique (van Breugel 1970), suggère que les délétions en question sont dues à des cassures du chromosome entre le centromère et l'organisateur nucléolaire, ce qui doit entraîner en règle générale la perte du fragment acentrique qui porte l'organisateur nucléolaire. Chez *D. melanogaster*, par contre, le chromosome X est acrocentrique et l'organisateur nucléolaire est localisé entre le centromère et la partie euchromatique (Cooper 1959). Ainsi, il est beaucoup moins facile chez cette espèce de produire des chromosomes X dépourvus d'un organisateur nucléolaire (Lindsley, Edington et von Halle 1960).

QUELQUES ASPECTS DE LA MUTAGENÈSE DANS LES OVOCYTES

L'analyse de la mutagenèse dans la lignée germinale mâle nous a indiqué que les spécificités du caryotype sont significatives surtout pour l'induction des mutations dominantes-létales. Pour les stades avancés de l'ovogenèse chez *D. melanogaster* il a été suggéré que la létalité dominante est en majeure partie due à des aneuploïdies graves (Muller 1954, Parker 1959). Notons que certaines configurations aneuploïdes sont bien tolérées chez *Drosophila* et que les zygotes formés à partir de gamètes complémentaires, hypo- et hyperploïdes, sont parfaitement viables. Les recherches sur la mutagenèse de telles aneuploïdies peuvent donc fournir des éclaircissements sur le mécanisme générateur de la condition létale-dominante. Chez *D. melanogaster*, les chromosomes X attachés sont particulièrement utiles dans ce but, puisqu'ils peuvent se séparer sous l'influence de rayons ionisants et se réunir avec des fragments dérivés des autres chromosomes (Herskowitz et Muller 1953, Parker 1959, 1963, 1969). Des chromosomes X attachés ont été produits expérimentalement chez *D. hydei* (Beck 1976, Gregg 1957). Ils représentent un matériel probablement unique pour une approche comparative parce que l'on peut provoquer des détachements par des méthodes similaires bien qu'à la base on ait affaire à un caryotype essentiellement différent (van Breugel 1970, Heitz 1933, Hess 1965). Notons qu'au cours

de l'ovogenèse, le noyau de l'ovocyte passe par des stades à radiosensibilité différente (Parker 1963, 1968). La chronologie du développement de ces cellules germinales n'est guère connue chez *D. hydei* (Kambysellis 1968). Il semblait donc utile d'orienter les expériences en premier lieu sur ces problèmes. La létalité dominante et le détachement des chromosomes X attachés ont été choisis comme critères de sensibilité. Pour connaître les phases sensibles de l'ovogenèse ainsi que leur durée, il était adéquat de fractionner les ovocytes en fonction de leur âge en analysant séparément la progéniture engendrée chaque jour après l'irradiation des femelles.

Létalité dominante : King, Darrow et Kaye (1956), Koch, Smith et King (1970) et Parker (1959, 1963) ont mis en évidence que les 14 stades successifs de l'ovogenèse chez *D. melanogaster* (King, Robinson et Smith 1956) sont différemment sensibles aux irradiations et que trois catégories d'ovocytes au moins peuvent être distinguées. En irradiant *D. hydei* avec 1 500 rad de rayons gamma, des résultats bien conformes ont été obtenus. Les ovocytes mûrs de la catégorie A sont particulièrement touchés et, une fois fécondés, seulement 10 à 20 % d'entre eux continuent le développement jusqu'au premier stade larvaire. Les œufs pondus du deuxième au cinquième jour suivant l'irradiation se développent mieux, la létalité frappant entre 20 et 30 % des embryons seulement. Cette progéniture doit dériver d'ovocytes irradiés à un stade submature, ce qui correspond à la catégorie B, telle qu'elle est définie pour *D. melanogaster* (King, Darrow et Kaye 1956). Il est vraisemblable que cette catégorie comprenne tous les stades du développement folliculaire dans le vitellarium, sauf les stades mûrs et à l'exception peut-être des stades les plus précoces qui feraient alors partie de la catégorie C, très peu sensible (Frei 1974a). Une distinction entre ces ovocytes primaires et les cystocytes ou même les ovogonies précurseurs ne semble pas possible étant donné que tous ces stades sont apparemment assez résistants aux irradiations (Koch, Smith et King 1970). Une létalité induite d'environ 5 % a été constatée pour cette catégorie mixte de cellules germinales dont dérivent les œufs pondus à partir du sixième ou septième jour après le traitement. Les ovocytes de la classe B semblent d'ailleurs, entre eux, différemment sensibles aux irradiations. Les résultats indiquent que parmi les ovocytes B, les stades les plus jeunes sont les plus sensibles. Environ cinq jours sont nécessaires jusqu'à ce que ce dernier groupe d'ovocytes ait atteint le stade de l'œuf mûr. A ma connaissance, il n'existe pas de données comparables chez *D. melanogaster*.

Détachement de chromosomes X attachés : Les détachements de chromosomes X attachés, provoqués par 1 500 rad de rayons gamma, sont observés à une fréquence d'environ 1 à 4 % dans la progéniture engendrée pendant les premiers 5 à 6 jours après le traitement. Par ce critère, les catégories d'ovocytes A et B sont moins distinctes que dans les expériences sur la létalité dominante. Une dose plus faible de 750 rad, moins sévère notamment pour la survie de la progéniture dérivant d'ovocytes A, a provoqué un taux légèrement plus élevé de détachements dans les ovocytes A (1,01 %) que dans l'ensemble des ovocytes B (0,73 %). Par contre, on obtient presque dix fois moins de détachements en irradiant les cellules germinales comprises dans la catégorie C : 0,25 % avec 1 500 rad et 0,13 % avec 750 rad (Tableau 1).

Finalement, il semble aussi justifié de distinguer un groupe d'ovocytes B jeunes d'un groupe avancé, parce que le fractionnement par pontes journalières amène en général un maximum de détachements récupérés dans les progénitures de la cinquième, parfois de la sixième journée expérimentale (Figure 1). Ces données quantitatives sont interprétées avec précaution, pour les raisons suivantes : d'abord, la méthode d'échantillonnage par pontes journalières n'amène pas des fractions pures (Frei 1974a), ce qui doit diminuer les pointes maximales et minimales dans un diagramme. Le dynamisme de l'ovogenèse, ensuite, peut affecter le pouvoir de résolution du fractionnement. La meilleure séparation est apparemment obtenue lorsque la période expérimentale coïncide avec une fécondité optimale des femelles (l'âge propice des femelles est de 7 à 17 jours environ chez *D. hydei*). Le développement peu synchrone dans les ovaires jeunes (Kambysellis 1968) est probablement la cause pour laquelle la différence en sensibilité entre les ovocytes B jeunes et avancés paraît effacée dans l'expérience menée avec des femelles irradiées jeunes (Figure 1a). Finalement, un développement ovarien quelque peu différé chez les femelles âgées (Figure 1c) pourrait avoir ralenti la transition B/C qui normalement intervient plus rapidement.

Il ressort de l'ensemble des expériences axées sur le détachement et la létalité dominante que la sensibilité n'augmente pas graduellement au cours du développement des ovocytes, mais par deux changements subits dont on peut assumer qu'ils marquent des transitions fondamentales du noyau méiotique. King (1970a, b) a proposé pour *D. melanogaster* que la sensibilité augmente plus ou moins continuellement et en parallèle avec les changements morphologiques du noyau germinale. Il estime que la catégorie C, peu sensible, correspond aux ovocytes au stade zygotène-pachytène et plus jeunes (cf. Koch, Smith et King 1970). La catégorie B, de sensibilité intermédiaire, comprendrait des ovocytes en diplotène. La transformation finale du complexe chromosomique en caryosphère sans membrane nucléaire est mise en relation avec la sensibilité accrue des ovocytes mûrs.

Chez *D. hydei*, les ovocytes mûrs se sont montrés beaucoup plus sensibles envers l'induction des mutations dominantes-létales que les stades précédents, ce qui est en accord avec l'observation faite auparavant chez *D. melanogaster*. Mais, contrairement aux interprétations favorisées par King (1970a), les résultats obtenus avec *D. hydei* suggèrent que les ovocytes en pachytène, notamment les stades 3 et 4 dans la nomenclature de King (1970b), sont tout aussi sensibles, voire même plus sensibles que ceux en diplotène (stades 7 à 13 selon King). Les arguments suivants contribuent à une telle interprétation :

1° — Selon Parker (1969), les détachements sont obtenus en prépondérance dans les ovocytes dont les paires de chromosomes homologues ont déjà atteint la configuration à quatre brins ("four strand stage"). Il s'est avéré que les ovocytes A (stade 14) et les ovocytes B (stade 7) se comportent très différemment dans les expériences d'irradiation. Pour ces deux stades, des différences quantitatives et qualitatives concernant la mutagenèse de la létalité dominante et du détachement sont superbement démontrées (cf. Parker 1959, 1963, 1968). La prophase précoce et moyenne est moins étudiée. Chez *D. hydei*, les détachements et les mutations dominantes-létales sont relativement fréquents pendant une période de 5 à 6 jours après l'irradiation. Les ovocytes A et B sont concernés. Le nombre d'œufs pondus pendant cette

période correspond assez bien au nombre d'ovocytes mûrs et submaturs qui se trouvent dans le vitellarium des ovarioles lors de l'irradiation. D'après King (1970b), le vitellarium contient les ovocytes submaturs en zygotène-pachytène et en diplotène, ainsi que les ovocytes mûrs, et il n'y a pas de raisons pour supposer que ce soit différent chez *D. hydei* (Kambysellis 1968). En conclusion, seuls les stades précoces de la prophase, qui sont principalement contenus dans le germarium et qui se trouvent en leptotène-zygotène, ne sont pas compris dans les catégories A et B d'ovocytes.

2° — Le développement final d'un ovocyte prend environ trois jours, chez *D. hydei*, à partir du stade 5, et deux jours approximativement à partir du stade 7 (Kambysellis 1968). Il s'en suit que les ovocytes B jeunes, dont dérivent les œufs pondus du 4^{ème} au 5^{ème} ou 6^{ème} jour après l'irradiation, étaient traités pendant une phase de développement antérieure au stade 5. Ils n'avaient donc pas encore atteint le stade du diplotène : selon King (1970b), seuls les stades 7 à 13 sont considérés comme ovocytes en diplotène. Les expériences menées avec *D. hydei* ont d'ailleurs montré une sensibilité légèrement supérieure des ovocytes B jeunes (4^{ème} et 5^{ème} journée en général) par rapport aux ovocytes B avancés (2^{ème} et 3^{ème} journée en général). Il faut considérer ces deux stades comme proches du pachytène ou proches du diplotène respectivement.

3° — Chez *D. melanogaster*, Parker (1959) et Würglér et Leuthold (1972) ont remarqué que le développement qui précède le diplotène (avant le stade 7) constitue une période de sensibilité accrue, si bien que l'irradiation avec des doses élevées (p. ex. 3 000 ou 4 000 R) peut entraîner la mort précoce des cellules germinales touchées. En admettant que la perte de chromosomes et la létalité dominante sont des phénomènes de mutation réciproquement liés, Traut (1964)

Page suivante :

Figure 1 — Relation entre la fréquence du détachement de chromosomes X attachés, l'âge des femelles irradiées et le dynamisme de l'ovogenèse.

Des femelles, C(1)RM/Y, ont été irradiées à des âges différents avec 1500 rad. Après le croisement, la progéniture endendrée a été élevée en fractions séparées à partir de pontes d'œufs journalières. Les fréquences de porteurs de chromosomes X détachés parmi les descendants sont indiquées pour chaque journée expérimentale. Les effectifs sont en général compris entre 1000 et 4000 animaux inspectés par jour et par série expérimentale. L'erreur standard, $(pq/N)^{1/2}$, est indiquée par des barres verticales.

- a) Femelles vierges, irradiées au début de la période féconde.
- b) Expériences avec des femelles vierges, irradiées à l'âge d'une semaine environ.
- c) Irradiation de femelles ayant atteint l'âge de reproduction optimale. Le choix de femelles non-vierges dans l'expérience principale tient compte de l'effet secondaire sur le dynamisme de l'ovogenèse qui pourrait éventuellement résulter d'une accumulation d'ovocytes mûrs dans les ovaires de femelles vierges. Les résultats obtenus à partir de femelles vierges et non-vierges sont cependant bien parallèles pendant les cinq jours initiaux pris en considération.

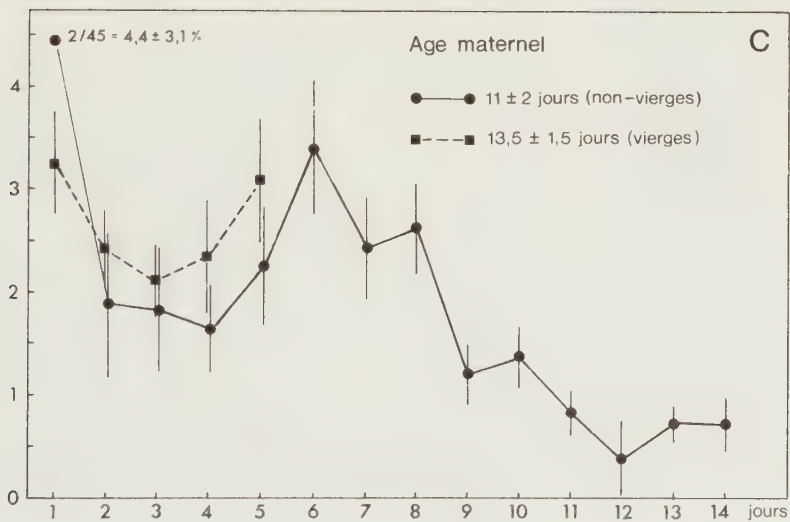
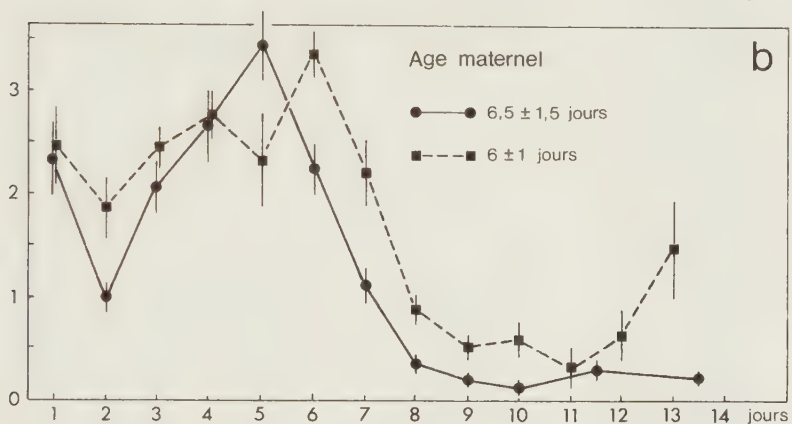
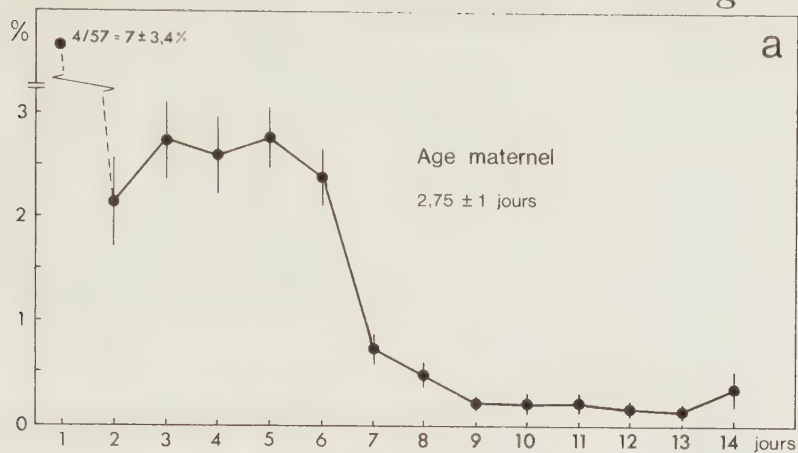


TABLEAU 1 - Fréquence de détachements de chromosomes X attachés dans les différents stades de l'ovogénèse. Induction par 750 et 1 500 rad.

Les femelles étaient irradiées à l'âge de $6,5 \pm 1,5$ jours pendant 4,5 minutes (750 rad) ou 9 minutes (1 500 rad). La progéniture montre un taux de détachement peu différent entre les ovocytes A et B, mais nettement inférieur pour la catégorie C. L'irradiation avec 1 500 rad a apporté plus de femelles que de mâles aux X détachés. Avec 750 rad, cette tendance ne s'annonce que dans la progéniture de la première journée expérimentale (ovocytes A, principalement).

I 750 rad		Détachements à la F ₁		Effectif N	Fréquence d'induction estimée pour les trois catégories principales d'ovocytes	II 1 500 rad	Détachements à la F ₁		Effectif N	Fréquence d'induction estimée pour les trois catégories principales d'ovocytes
		♀	♂				♀	♂		
Journée 1	37	13		4965	A : 50/4965(1,01%)	Journée 1	37	9	1959	A : 46/1959(2,35%)
2	12	13		3999			38	11	4945	
3	12	13		3151	B : 80/10957(0,73%)	3	32	40	3483	B : 275/13368(2,06%)
4	5	5		1544		4	31	25	2100	
5	9	11		2263	période transitoire	5	57	41	2840	période transitoire
6	11	8		2535		6	46	34	3561	
7	1	2		1135	C : 10/7543(0,13%)	7	25	16	3641	C : 37/15035(0,25%)
8	2	0		1461		8	7	3	2880	
9	3	0		1658		9	5	1	3016	
10	2	0		1094		10	0	2	1752	
11-12	0	2		2532		11-12	7	3	3381	
13-14	1	0		798		13-14	8	1	4006	

TABLEAU 1 (suite) – Fréquence de détachements de chromosomes X attachés dans les différents stades de l'ovogenèse. Induction par 750 et 1 500 rad.

Valeurs groupées. Un rapport de 1/2 entre les doses appliquées s'est exprimé par un rendement plus grand que le double pour la dose supérieure (ovocytes A et B). L'accroissement au-dessus de la linéarité est plus prononcé pour les détachements récupérés chez les femelles. Les données indiquent que les ovocytes B jeunes contribuent le plus à la déviation de la linéarité.

(*) : Déviation significative au niveau de 5%, $\chi^2 = (2P_I - P_{II})^2 / (4P_I q_I / N_I + P_{II} q_{II} / N_{II})$, 1 degré de liberté.

Journées	Catégorie principale d'ovocytes	I					II					II/I				
		Détachements		Effectif N	Fréquences %		Détachements		Effectif N	Fréquences %		Dose dédoublée: rendement relatif (P _{II} /P _I) ♀ ♂ ♀ ♂				
		♀ ♀	♂ ♂		p ♀	p ♂	p ♀ ♂	♀ ♀		♂ ♂	p ♀			p ♂	p ♀ ♂	
1	A	37	13	4965	0,75	0,26	1,01	37	9	1959	1,89	0,46	2,35	2,53	1,75	2,33
2-3	B avancés	24	26	7150	0,34	0,36	0,70	70	51	8428	0,83	0,61	1,44	2,47	1,66	2,05
4-5	B jeunes	14	16	3807	0,37	0,42	0,79	88	66	4940	1,78	1,34	3,12	4,84*	3,18	3,96*
6-7	B-C	12	10	3670	0,33	0,27	0,60	71	50	7202	0,99	0,69	1,68	3,02	2,55	2,80
1-7	A-B (C)	87	65	19592	0,44	0,33	0,78	266	176	22529	1,18	0,78	1,96	2,66*	2,36	2,53*
8-12	C	8	2	7543	0,11	0,03	0,13	27	10	15035	0,18	0,07	0,25	1,69	2,51	1,86

a pu mettre en évidence deux groupes d'ovocytes relativement sensibles : en conséquence de la létalité induite, les descendants des deux groupes manquent dans la progéniture survivante lorsque une dose critique d'environ 2000 R et 3500 R respectivement est dépassée. En résumé, il me semble justifié de conclure que les ovocytes mûrs, succombant à 2000 R, et les ovocytes en pachytène, succombant à 3000-4000 R, correspondent aux deux groupes les plus sensibles de l'ovogenèse.

Dans les expériences présentées, les pontes de la première journée (ovocytes A) et des journées suivantes (ovocytes B) ne diffèrent que peu dans la fréquence des détachements. En se référant à *D. melanogaster*, il faudrait s'attendre à une différence plus accentuée (cf. Parker 1963). Il est possible que certains inconvénients techniques (sélection contre les ovocytes extrêmement sensibles, impuretés des fractions journalières) soient à la base de cette observation. Cependant, il faut prendre en considération le fait que la réalisation du détachement est qualitativement différente dans les ovocytes mûrs et submaturs (Parker 1963) et que la constitution du caryotype y est de première importance (Parker 1968). Chez *D. hydei*, les chromosomes X attachés sont en règle générale des chromosomes composés du type "Compound-1, Reversed Metacentric" (Beck 1976, van Breugel 1970, Gregg 1957, Hess 1965). Ils diffèrent pourtant des chromosomes du même type chez *D. melanogaster* par l'absence d'organiseurs nucléolaires (Hennig 1968). La présence d'un chromosome Y est donc de rigueur chez les femelles aux X attachés. De toute vraisemblance, la région centrique des chromosomes X attachés ne contient ni centromère ni hétérochromatine dérivés du chromosome Y (Beck 1976), ce qui contraste avec la composition présumée de tels chromosomes chez *D. melanogaster* (Lucchesi 1965). En outre *D. hydei* possède quatre paires d'autosomes acrocentriques qui constituent les éléments homologues aux bras des deux paires métacentriques de *D. melanogaster* (Spencer 1949). Puisque la production de chromosomes X détachés est liée à la réalisation de demi-translocations¹ du type X-Y ou X-autosome (Parker 1963), il est raisonnable de penser que les demi-translocations du second type se retrouvent plus souvent chez *D. hydei* que chez *D. melanogaster*. On s'attend notamment à des échanges impliquant les régions centriques des autosomes. Les résultats obtenus à ce sujet (Frei et Beck, non publié) justifient cette supposition, du moins quant à l'induction dans les ovocytes B. Chez *D. melanogaster*, l'événement parallèle n'est pas exclu, mais il en résulterait des zygotes aneuploïdes, incapables de survie.

Le taux des détachements, enregistré pour les différents stades de l'ovogenèse, est sans doute en corrélation avec la sensibilité du génome envers les lésions de cet ordre, mais il faut envisager d'autre part que le type de demi-translocations, qui apparaît spécifiquement chez *D. hydei*, pourrait modifier les proportions dans lesquelles les détachements sont obtenus à partir d'ovocytes A ou B.

1 — "Demi-translocation" : Traduction du terme *half-translocation*, d'usage dans la littérature d'expression anglaise (Abrahamson, Herskowitz et Muller, 1954).

RECOMBINAISON INTRAGÉNIQUE ET LA STRUCTURE FINE DU GÈNE WHITE

Le taux de mutations récessives-létales induites expérimentalement sur les chromosomes X de *D. hydei*, *D. melanogaster* et probablement d'autres espèces, montre une constance remarquable (Frei 1974b), ce qui fait supposer que le nombre de gènes essentiels à la survie, présents dans ces chromosomes, est à peu près constant. D'autre part, les cartes génétiques sont variables en longueur (Perje 1955, Spencer 1949, Spurway 1945). La longueur des chromosomes en unités de recombinaison est pourtant une mesure indirecte, si bien que les différences entre espèces pourraient dépendre du nombre moyen de chiasmata réalisés par chromosome sans que cela implique des divergences réelles en longueur physique. A noter que les données cytologiques pertinentes sont singulièrement rares chez les drosophiles. D'autre part, il est possible que les chromosomes ne se composent pas uniquement d'ADN codant pour les ARN fonctionnels. Ainsi, le taux d'échange pourrait apporter une mesure qui concerne aussi un ADN intercalé entre les gènes. Il semble donc intéressant de comparer les fréquences d'échange au niveau du chromosome entier et au niveau du gène. C'est dans ce contexte que j'ai entrepris une étude comparative des échanges intragéniques dans une région comparable chez *D. hydei* et *D. melanogaster*. En choisissant le gène *white*, qui est connu par des mutations chez un grand nombre d'espèces (Chino 1936, Perje 1955, Spencer 1949, 1957, Spurway 1945, Sturtevant et Novitski 1941), on compare pour la première fois la structure fine d'un gène, homologue sans doute, et commun à tous les représentants du genre *Drosophila*.

Chez *D. melanogaster*, le gène *white* a fait l'objet de recherches approfondies au moyen du crossing-over intragénique (Carlson 1959, Green 1959a, Judd 1959). Les sites mutés des différents allèles ne sont pas distribués au hasard sur la carte de recombinaison, mais localisés dans cinq régions variablement espacées ("subloci"). Les expériences menées avec *D. hydei* ont montré que les quatre mutations disponibles s'arrangent sur trois subloci. Les manifestations phénotypiques, conjointement avec la distribution des sites sur la carte du gène suggèrent une organisation similaire de la structure interne du locus *white* chez les deux espèces, tout au moins en ce qui concerne la partie renfermant les trois subloci principaux.

Trois mutations secondaires étudiées chez *D. hydei* dérivent du mutant w^{iv} . Elles occupent la partie proximale du gène comme c'est le cas pour la mutation primaire. Une situation similaire est connue chez *D. melanogaster* : la série allélique de w^I , avec trois mutants dérivés, occupe le sublocus 4 (Green 1959a, 1965). Ce sublocus nous semble homologue au site w^{iv} de *D. hydei* pour les raisons énoncées plus haut.

Deux des mutations secondaires chez *D. hydei* ont apporté une classe inattendue de recombinants. Une explication serait de supposer que les allèles en question représentent des mutations doubles avec des sites séparables par recombinaison intragénique, mais compte tenu des alternatives formulées au sujet de certaines complications similaires chez *D. melanogaster* (Green 1959b, 1963), il est également possible que le crossing-over inégal soit à la base des échanges exceptionnels repérés ou que ce mécanisme soit lui-même à

l'origine de ces mutations secondaires.

Chez les deux espèces, l'échange intragénique est associé, à quelques exceptions près, à un crossing-over entre les gènes marqueurs de part et d'autre du locus *white* (Green 1959a, 1960, 1965). Il s'en suit que l'échange intragénique par conversion n'est pas typique du gène *white* en général, bien que ce mode de recombinaison caractérise quelques autres gènes de *D. melanogaster* (Chovnick, Ballantyne et Holm 1971, Carlson 1971, Finnerty, Duck et Chovnick 1970).

La recombinaison entre différents allèles du gène *white* est un phénomène relativement fréquent chez *D. hydei*; la distance entre les subloci extrêmes w^{ak} et w^{iv} s'estime à 1/20 d'une unité Morgan. Chez *D. melanogaster*, la région supposée homologue ne mesure que 1/100 d'une unité Morgan. En tenant compte des mutations moins communes, aux deux subloci extrêmes (connus chez *D. melanogaster* seulement) on arrive à une étendue dans l'ordre de 1/40 d'une unité Morgan pour la carte intégrale du locus chez cette espèce (Carlson 1959, Lindsley et Grell 1968). Il est possible que l'Effet de Schultz et Redfield (1951) ait été surestimé dans son efficacité d'augmenter les échanges intragéniques (cf. Green 1959a, Carlson 1972) et que les distances rapportées pour *D. melanogaster* représentent des approximations quelque peu trop larges. L'évaluation la plus vraisemblable de la situation chez cette espèce amène à la conclusion (Frei 1975) que les échanges à l'intérieur du gène *white* sont au moins deux fois plus fréquents chez *D. hydei*. Spencer (1949) a trouvé des rapports similaires en comparant les cartes génétiques des chromosomes X entiers. Il convient donc de mettre en relation directe les échanges intragéniques et intergéniques, puisque les deux ont une plus grande chance de réalisation chez *D. hydei*.

DISCUSSION

(1)

Le taux de mutations récessives-létales, induites aux rayons X est similaire chez *D. melanogaster* et chez *D. hydei*.

Bien que les expériences présentées ne portent que sur le chromosome X de *D. hydei*, on peut conclure par extension que le génome entier des deux espèces mentionnées ne diffère pas sensiblement dans la mutabilité de ce type. Le résultat présent et d'autres résultats similaires (Christie 1939, Keller et Lüers 1937, Timoféeff-Ressovsky 1939, Traut 1963) suggèrent que le nombre de gènes essentiels à la survie est du même ordre chez différentes espèces de *Drosophila*.

Etant donné que le nombre de bandes chromomériques dans les chromosomes polytènes est environ 50% moindre chez *D. hydei* que chez *D. melanogaster* (Berendes 1963, Berendes, Alonso, Helmsing, Leenders et Derksen 1973, Laird 1973), il devient douteux que l'hypothèse "one band - one gene" soit applicable sans modifications à

tous les Diptères présentant des chromosomes géants (cf. Green 1963, Laird 1973, Lefevre 1974, Welshons et Keppy 1975, Sorsa, Green et Beermann 1973).

Retenons que les cartes génétiques des groupes de linkage homologues chez différentes espèces de *Drosophila* varient en longueur du simple au double, voire au triple (Chino 1936, Perje 1955, Spencer 1957, Spurway 1945). Notamment le chromosome X de *D. hydei* mesure 116 unités Morgan par opposition aux 70 unités de l'élément homologue chez *D. melanogaster* (Spencer 1949). Il est plus simple d'admettre que cette variabilité est du ressort de mécanismes régulateurs de l'échange génétique que de supposer qu'elle reflète directement des variations de la dimension physique des chromosomes homologues. Cependant, on reconnaît que la recombinaison par crossing-over pourrait largement dépendre d'un ADN intercalaire, situé entre les gènes et à l'intérieur de gènes complexes (Bonner et Wu 1973, Laird 1973, Stern et Hotta 1974). On n'exclue pas l'existence d'une telle composante, mais alors, elle doit échapper à la mise en évidence par un test de mutagenèse ayant pour cibles les seuls gènes susceptibles de mutations létales.

(2)

La carte du gène *white* chez *D. hydei* mesure 1/20 d'une unité Morgan au minimum. L'échange à l'intérieur du gène met en évidence une structure fine et un mode de recombinaison qui coïncident à bien des égards avec les caractéristiques du gène homologue chez *D. melanogaster*.

En se basant sur la dimension probablement "moyenne" du gène *white* (1/20 à 1/10 d'une unité Morgan) et sur celle du génome en entier (chez *D. hydei* entre 500 et 1000 unités Morgan) on peut estimer que 5000 à 20000 séquences de longueur comparable au gène *white* correspondent au total des gènes. Cette estimation est conforme à d'autres, visant directement le nombre total des gènes (cf. Lefevre 1974, Strickberger 1968, p. 525). A titre indicatif, on peut alors déduire que le gène *white* est bien un segment représentatif du chromosome dans ce sens qu'il montre les caractéristiques de recombinaison d'un quelconque segment de dimension similaire logé dans l'euchromatine des chromosomes. En d'autres termes, il est peu probable qu'il existe des régions spécialisées dans le crossing-over entre différents gènes par opposition à d'autres qui détermineraient essentiellement le crossing-over intragénique.

D. hydei et *D. mulleri* sont les espèces type de deux sous-groupes d'espèces inclus dans le groupe *repleta*. L'arrangement des gènes homologues et la séquence des bandes chromomériques dans les chromosomes X polytènes sont entièrement correspondants (Spencer 1957, Wasserman 1954, 1962b,c). Cependant, les cartes génétiques des chromosomes X indiquent que les crossing-over le long du chromosome entier sont environ 50% plus fréquents chez *D. mulleri*.

D'autre part, les chromosomes X de *D. hydei* et de *D. melanogaster* sont incongruents. Les gènes homologues sont arrangés dans un ordre différent (Spencer 1949). Aussi est-il pratiquement impossible de déterminer les régions homologues dans les chromosomes polytènes, les bandes chromomériques ne permettant pas en général de reconnaître des séquences comparables. Exceptionnellement, un rapprochement semble possible pour des régions assez

restreintes où l'homologie est indiquée par d'autres critères. Ainsi, van Breugel, Ray et Gloor (1968) ont trouvé une similitude de la séquence des bandes dans la région qui renferme les deux loci homologues *white* et *Notch*. Il est donc concevable que la structure de cette partie du génome est identique chez les deux espèces.

Dans ce contexte, il est rassurant que le gène *white* est structuré d'une façon similaire chez *D. hydei* et *D. melanogaster*. La position des subloci probablement homologues est en parfait accord par rapport à la position du gène *Notch* avoisinant. Par contre, les échanges à l'intérieur du gène *white* sont plus fréquents chez *D. hydei*. Les échanges entre les gènes du chromosome X, notamment aussi entre *white* et *Notch*, sont également plus fréquents (Spencer 1949).

L'ensemble des observations suggère que nous avons affaire à une différence génétique entre les espèces *D. melanogaster* et *D. hydei*, mais aussi entre *D. hydei* et *D. mulleri*, qui concerne avant tout une propriété générale et fonctionnelle du mécanisme qui amène les échanges génétiques. Si la plus grande fréquence des échanges intragéniques au locus *white* de *D. hydei* indiquait une différence dans l'organisation régionale dans cette partie du chromosome, il faudrait postuler qu'il en soit de même pour tous les autres gènes du génome, les éventuelles composantes intercalées y incluses.

Notons que d'autres gènes chez *D. melanogaster* possèdent des cartes de recombinaison plus courtes ou plus longues de 1 à 2 ordres de grandeur par rapport à *white*. Chovnick, Ballantyne, Baillie et Holm (1970) font remarquer que les gènes les plus courts, notamment *maroon-like* (Finnerty, Duck et Chovnick 1970), se distinguent par un mode presque exclusif de recombinaison qui cadre avec le mode d'échange par conversion (Ce mode de recombinaison est surtout connu chez un grand nombre de champignons. Une revue générale traitant de plus près les aspects de la conversion est donnée par Whitehouse, 1973, p. 327-371). Pour ces gènes, l'image d'une organisation complexe comprenant différents subloci largement séparés ne semble pas appropriée. Ils sont d'autre part considérés monocistroniques (Chovnick, Finnerty, Schalet et Duck 1969, Gelbart, McCarron, Pandey et Chovnik 1974, McCarron, Gelbart et Chovnik 1974). La présente étude avec *D. hydei* a apporté un seul cas d'échange qui peut être rapproché de la conversion. Le compound w^{ak}/w^{sw2} soumis au test d'échange comprenait deux allèles dont les sites mutés sont apparemment très proches. Il se peut que l'un d'eux (w^{sw2}) soit situé dans le même sublocus qui comprend la mutation w^{a2} chez *D. melanogaster*. Green (1960) a mené une série d'expériences avec w^{a2} qui avaient ceci d'exceptionnel qu'elles montraient des échanges intragéniques rappelant la conversion. La mise en évidence de phénomènes de conversion au locus *white* pourrait donc dépendre de préalables tels qu'une distance relativement courte entre les mutations hétéro-alléliques et une éventuelle spécificité allélique (cf. Whitehouse 1973 p. 362 et 370).

Plusieurs raisons ont amené Green (1959a, 1969) et d'autres auteurs (Kalisch et Rasmuson 1974, van Breugel 1970) à considérer le gène *white* comme fonctionnellement diversifié et composé de plusieurs cistrons. Contrairement à ce qui est observé pour le gène *rosy*, qui semble monocistronique (Gelbart, McCarron, Pandey et Chovnick 1974, McCarron, Gelbart et Chovnick 1974), le crossing-over intragénique au locus *white* peut mener à des recombinants exceptionnels que l'on interprète comme étant dus à un

crossing-over inégal (Green 1959b, 1963). Comme l'exposent Bonner et Wu (1973), il est tentant de rapprocher l'appariement décalé des chromosomes ou l'échange inégal lui-même à la présence répétée de séquences d'ADN ayant des affinités respectives. Le crossing-over inégal à l'intérieur du gène pourrait être limité aux gènes composés de plus d'un cistron. Dans le cas de *white* on peut supposer que les unités cistroniques ou les subloci largement espacés soient séparés par un ADN facilitant les échanges irréguliers.

Trois mutations secondaires dérivant d'un allèle muté (w^{iv}) ont été identifiées chez *D. hydei*. Toutes ont typiquement apporté un changement dans l'expression phénotypique ("réversion partielle"). Deux d'entre elles ont produit des recombinants exceptionnels dont l'apparition peut être mise en relation directe ou indirecte avec le crossing-over inégal. De toute évidence, il serait trop simpliste d'admettre que le gène soit composé de sous-unités avec des fonctions spécialisées, les unes responsables de la seule manifestation phénotypique, les autres nécessaires dans la réalisation des échanges. Quelle que soit la nature du changement mutationnel au niveau structural, il est devenu évident que les propriétés d'échange sont différentes pour chacune des trois mutations dans le "compound" avec w^{ak} :

- w^{ml} : deux types de recombinants réciproques ont été obtenus à fréquences égales.
- w^{hg} : les échanges réciproques ont été obtenus à fréquences égales, mais parmi les recombinants un type exceptionnel est apparu.
- w^{fr} : apparemment, les échanges réciproques se réalisent à des fréquences inégales; un type exceptionnel de recombinants a été trouvé qui diffère de celui obtenu à partir de w^{hg} .

Il faut tenir compte de la possibilité que le crossing-over inégal est à même de produire des duplications du gène (Judd 1961, Gersh 1962, Green 1963). D'autre part, quelques gènes seulement sont reconnus répétitifs chez *Drosophila* (Tartof 1975, Wimber et Steffensen 1973). On entrevoit donc un mécanisme généralement opposé à l'accumulation de gènes du même type. Dans ce sens on peut imaginer qu'un gène, ayant acquis la particularité de participer à des échanges inégaux, devienne le plus souvent incapable d'exercer des fonctions à tous égards normales. Sans contrebalance sélective, il serait difficile de comprendre pourquoi les organismes capables de produire le crossing-over inégal n'ont pas atteint au cours de l'évolution un stade où tous les gènes sont plus ou moins répétitifs. Il serait aussi peu probable que les gènes homologues chez différentes espèces aient conservé une structure interne similaire. C'est pourtant une des suggestions qui découle de la comparaison du gène *white* chez *D. melanogaster* et *D. hydei*.

(3)

Certains phénomènes de mutagenèse se manifestent avec exclusivité chez *D. hydei* (délétions du gène *bobbed*, cf. note explicative²) ou alors d'une manière plus accentuée par rapport à *D. melanogaster* (léthalité dominante liée au sexe). Les stades successifs dans le développement des ovocytes se sont montrés différemment sensibles à l'irradiation. Ceci était attendu, mais les deux critères de sensibilité appliqués dans les expériences (l'induction de chromosome X détachés et la léthalité dominante) n'ont pas apporté à tous les égards des résultats conformes aux investigations avec *D. melanogaster*.

Ces divergences apparentes entre les deux espèces ont en commun qu'elles peuvent être attribuées aux différences cytologiques entre les garnitures de chromosomes.

La léthalité dominante liée au sexe s'explique le mieux par la taille différente des chromosomes sexuels X et Y, qui rend plus sensibles les spermatozoïdes avec un X. En d'autres termes, les noyaux haploïdes contenant plus d'ADN représentent des cibles plus accessibles à l'induction de lésions délétères. Une telle interprétation est conforme à l'expérience acquise avec *D. pseudoobscura* notamment (Morgan, Bridges et Schultz 1930, Schultz 1933). Contrairement à la majorité des mutations récessives, la léthalité dominante dépend non seulement de l'euchromatine mais encore de l'hétérochromatine (Leuthold 1972, Lindsley, Edington et von Halle 1958). L'apport à la génétique comparative est donc de signification fondamentalement différente si une comparaison entre espèces est basée sur des tests de léthalité dominante ou récessive, les premiers visant principalement le contenu brut en matière héréditaire, les seconds plus spécialement une composante dont font partie les gènes essentiels. En conclusion, il semble bien qu'il y a des différences dans l'organisation génétique des espèces de *Drosophila* qui sont significatives pour la réalisation de mutations, mais elles ne concernent guère le niveau des gènes.

Les délétions de *bobbed*, induisibles dans la diplophase de la spermatogenèse ($2n$ ou $4n$ de chromatides) et les X détachés, formés principalement dans les ovocytes au "four strand stage" (Parker 1969), peuvent avoir une origine comparable ou même équivalente. Je favorise l'idée que les deux types de mutations représentent des demi-translocations entre le X et les autres chromosomes. Pour les détachements provoqués dans les ovocytes, c'est indiscutablement le cas (Parker 1963, Hess 1965). C'est d'autre part l'hypothèse la plus plausible pour expliquer les délétions de *bobbed* sur le chromosome X que l'on peut obtenir en irradiant les cellules de la lignée germinale mâle de *D. hydei*. Considérons les raisons les plus importantes:

1° — Les délétions sont induisibles pendant une période limitée de la spermatogenèse. Chez *D. melanogaster*, il a été constaté que pendant cette période des échanges peuvent être induits qui concernent notamment l'hétérochromatine (Fahmy et Fahmy 1964,

2 — Les délétions très peu fréquentes du gène *bobbed* obtenues chez *D. melanogaster* (Lindsley, Edington et von Halle, 1960) sont probablement dues à une induction dans les stades post-méiotiques de la spermatogenèse. Moins rares chez *D. hydei*, les chromosomes X déficients pour le gène *bobbed* s'obtiennent spécifiquement après une irradiation de spermatogonies et/ou de spermatocytes.

Leigh 1969, Leigh et Sobels 1970, Olivieri et Olivieri 1964). La perte du gène *bobbed* du chromosome X chez *D. hydei* nécessite la cassure du bras hétérochromatique qui porte en position subterminale l'organisateur nucléolaire (l'équivalent cytologique du gène *bobbed*).

2° — La perte du fragment acentrique, apportant la délétion, demande la réunion du chromosome subsistant avec un autre élément de manière à ne pas laisser l'endroit de rupture dans un état où il serait dépourvu de "télomère" (cf. Muller 1954).

3° — Les demi-translocations ne représentent que la moitié d'une translocation réciproque (Abrahamson, Herskowitz et Muller 1954). Par définition il est clair que leur réalisation est liée à l'élimination du complément des fragments réciproques (cf. Parker 1969). Une telle perte doit apporter une hypoploïdie si les cellules germinales sont irradiées pendant l'haplophase, mais elle peut être surmontée si d'autres chromosomes indemnes comblent la lacune. Chez *D. hydei*, cela semble possible dans la diplophase où les noyaux contiennent $2n$ ou $4n$ de chromatides; les demi-translocations impliquant la perte de bras entiers des autosomes acrocentriques sont récupérables. On s'explique en même temps pourquoi les délétions de *bobbed* dérivent exclusivement de noyaux irradiés en méiose précoce ou plus jeunes.

4° — Contrairement à *D. melanogaster*, les grands autosomes sont acrocentriques chez *D. hydei*. Cela rend possible un type de demi-translocations qui n'est d'habitude pas récupéré chez *D. melanogaster*. Il s'agit de demi-translocations X autosome qui sont remarquablement fréquentes parmi les X détachés (Frei et Beck, non publié). Soumis au test approprié, ces chromosomes s'avèrent dépourvus d'information *bobbed*⁺. En d'autres termes, on peut obtenir dans la lignée germinale femelle des demi-translocations ayant la même propriété principale que les chromosomes mutants avec la délétion de *bobbed* qui sont produits dans la lignée germinale mâle.

L'induction de chromosomes X détachés demande des investigations ultérieures, ayant trait surtout aux points de cassure dans les chromosomes participant à l'échange. Les détachements récupérés chez *D. melanogaster* et chez *D. hydei* ne semblent pas correspondre qualitativement, à cause des différences dans l'organisation des caryotypes. Il faut envisager que cet événement de mutation n'est que superficiellement semblable chez les deux espèces. On ne peut donc se prononcer définitivement sur les causes qui ont amené une réponse quantitativement similaire des ovocytes A et B chez *D. hydei*.

RÉSUMÉ

Des expériences de mutagenèse par irradiation et une analyse de la structure fine d'un gène chez *Drosophila hydei* ont été entrepris dans le but de mieux connaître les différences et les correspondances dans l'organisation génétique des espèces du genre *Drosophila*. Une grande partie des comparaisons est cependant limitée aux deux espèces *D. melanogaster* et *D. hydei*. Certaines extrapolations d'une portée plus générale semblent pourtant possibles. Notamment, les conclusions suivantes semblent justifiables, tout en reconnaissant que dans certains cas de plus amples évidences seraient encore désirables.

1° - Le génome des différentes espèces est invariable ou peu variable dans le nombre de gènes essentiels qu'il renferme.

2° - La longueur des cartes génétiques des chromosomes homologues, qui est souvent très diverse, ne permet pas de conclure directement à la longueur physique des chromosomes.

3° - L'organisation interne des gènes homologues n'a pas changé ou peu changé au cours de l'évolution des espèces de *Drosophila*. L'arrangement de ces gènes sur les chromosomes homologues a d'autre part souvent été remanié.

4° - Les différences dans le caryotype des espèces sont significatives dans ce sens qu'elles rendent possible des types de mutations qui sont dans une certaine mesure spécifiques à l'espèce. La présence de chromosomes métacentriques ou acrocentriques et l'arrangement de l'hétérochromatine dans le génome semblent déterminants dans ce contexte.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamson S., I.H. Herskowitz and H.J. Muller : Genetic proof for half-translocations derived from irradiated oocytes of **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **39**, 955 (1954). Abstract.
- Auerbach C. : Sensitivity of the **Drosophila** testis to the mutagenic action of X-rays. *Z. Induktive Abstamm. - u. Vererbungslehre* **86**, 113-125 (1954).
- Bauer H. : Die Dosisabhängigkeit röntgeninduzierter Chromosomenmutationen im Ring-X-Chromosom von **Drosophila melanogaster**. *Naturwissenschaften* **27**, 821-822 (1939).
- Beck H. : New compound (1) chromosomes and the production of large quantities of X/O males in **Drosophila hydei**. *Genet. Res.* **26**, 313-317 (1976).
- Berendes H.D. : The salivary gland chromosomes of **Drosophila hydei** Sturtevant *Chromosoma* **14**, 195-206 (1963).
- Berendes H.D., C. Alonso, P.J. Helmsing, H.J. Leenders and J. Derksen : Structure and function in the genome of **Drosophila hydei**. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 645-654 (1973).
- Bonner J. and J.-R. Wu : A proposal for the structure of the **Drosophila** genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 535-537 (1973).
- Breugel F.M.A. van : An analysis of white-mottled mutants in **Drosophila hydei** with observations on X-Y exchanges in the male. *Genetica* **41**, 589-625 (1970).
- Breugel F.M.A. van, A. Ray and H. Gloor : A comparison of banding patterns in salivary gland chromosomes of two species of **Drosophila**. *Genetica* **39**, 165-192 (1968).
- Buzzati-Traverso A.A. and R.E. Scossiroli : The "Obscura Group" of the genus **Drosophila**. *Adv. Genet.* **7**, 47-92 (1955).
- Carlson E.A. Comparative genetics of complex loci. *Quart. Rev. Biol.* **34**, 33-67 (1959).
- Carlson P.S. : A genetic analysis of the rudimentary locus of **Drosophila melanogaster**. *Genetic Res.* **17**, 53-81 (1971).
- Carlson P.S. : The effects of inversions and the C(3)G mutation on intragenic recombination in **Drosophila**. *Genet. Res.* **19**, 129-132 (1972).
- Chino M. : Genetics of **Drosophila virilis** (en japonais). *Jap. J. Genet.* **12**, 257-277 (1936).
- Chovnick A., G.H. Ballantyne, D.L. Baillie and D.G. Holm : Gene conversion in higher organisms : Half-tetrad analysis of recombination within the *rosy* cistron of **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **66**, 315-329 (1970).
- Chovnick A., G.H. Ballantyne and D.G. Holm : Studies on gene conversion and its relationship to linked exchange in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **69**, 179-209 (1971).
- Chovnick A., V. Finnerty, A. Schalet and P. Duck : Studies on genetic organization in higher organisms : I. Analysis of a complex gene in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **62**, 145-160 (1969).
- Christie A.L.M. : The effect of X-rays on sex in **Drosophila subobscura** and an account of some sex-linked characters. *J. Genet.* **39**, 47-60 (1939).

- Cooper K.W. : Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially XH and Y) in **Drosophila melanogaster**, and the theory of heterochromatin. *Chromosoma* **10**, 535-588 (1959).
- Fahmy O.G. and M.J. Fahmy : Radiosensitivity of the stages of spermatogenesis to different mutations in **Drosophila melanogaster**. *Mutation Res.* **1**, 247-267 (1964).
- Finnerty V.G., P. Duck and A. Chovnick : Studies on genetic organization in higher organisms, II. complementation and fine structure of the **maroon-like** locus of **Drosophila melanogaster**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **65**, 939-946 (1970).
- Frei H. : Radiation-induced dominant lethality in oocytes of **Drosophila hydei**, with emphasis on the differential sensitivity of the immature stages in class B. *Mutation Res.* **24**, 125-134 (1974a).
- Frei H. : Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der Spermatogenese von **Drosophila hydei**, Letalraten und die Bedeutung der arteigenen genetischen Organisation. *Archiv für Genetik* **47**, 136-171 (1974b).
- Frei H. : Intragenic recombination at the **white** locus of **Drosophila hydei**. *Molec. gen. Genet.* **142**, 105-117 (1975).
- Gelbart W.M., M. McCarron, J. Pandey and A. Chovnick : Genetic limits of the Xanthine dehydrogenase structural element within the **rosy** locus in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **78**, 869-886 (1974).
- Gersh E.S. : Cytological analysis of some stocks of **Drosophila melanogaster** derived by unequal crossing over at or near the **white** locus. *Genetics* **47**, 1393-1398 (1962).
- Green M.M. : Spatial and functional properties of pseudo-alleles at the **white** locus in **Drosophila melanogaster**. *Heredity* **13**, 303-315 (1959a).
- Green M.M. : Putative non-reciprocal crossing over in **Drosophila melanogaster**. *Z. Vererbungsl.* **90**, 375-384 (1959b).
- Green M.M. : Double crossing over or gene conversion at the **white** loci in **Drosophila melanogaster** ? *Genetics* **45**, 15-18 (1960).
- Green M.M. : Unequal crossing over and the genetical organization of the **white** locus of **Drosophila melanogaster**. *Z. Vererbungsl.* **94**, 200-214 (1963).
- Green M.M. : Genetic fine structure in **Drosophila**. In : *Genetics Today* (Proc. XIth Int. Congr. Genet., The Hague 1963; S.J. Geerts, ed.), vol. 2, p. 37-49. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1965.
- Green M.M. : Controlling element mediated transpositions of the **white** gene in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **61**, 429-441 (1969).
- Gregg T.G. : The production of attached-X chromosomes in **Drosophila hydei**. *Univ. Texas Publ.* **5721**, 238-245 (1957).
- Gregg T.G. and L.A. Smucker : Pteridines and gene homologies in the eye color mutants of **Drosophila hydei** and **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **52**, 1023-1034 (1965).
- Hadorn E. : Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1955.
- Hauschteck-Jungen E., H. Jungen und M. Müller : Karyotyp und Meiose bei wild- und sex ratio-Männchen von **Drosophila subobscura**. *Revue Suisse Zool.* **79** (Suppl., Festschrift E. Hadorn), 297-305 (1972).
- Heitz E. : Die somatische Heteropyknose bei **Drosophila melanogaster** und ihre genetische Bedeutung (Cytologische Untersuchungen an Dipteren. III). *Z. Zellforsch. mikroskop. Anat.* **20**, 237-287, und Tafeln I-II (1933).
- Hennig W. : Ribonucleic acid synthesis of the Y chromosome of **Drosophila hydei**. *J. Mol. Biol.* **38**, 227-239 (1968).

- Hennig W., B. Link and O. Leoncini : The location of the nucleolus organizer regions in **Drosophila hydei**. *Chromosoma* **51**, 57-63 (1975).
- Herskowitz I.H. and H. J. Muller : Evidence against the healing of X-ray breakages in chromosomes of female **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **38**, 669 (1953). Abstract.
- Hess O. : Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom von **Drosophila hydei** und ihre Beziehungen zu Genaktivitäten. III. Sequenz und Lokalisation der Schleifenbildungsorte. *Chromosoma* **16**, 222-248 (1965).
- Judd B.H. : Studies on some position pseudo-alleles at the **white** region in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **44**, 34-42 (1959).
- Judd B.H. : Analysis of products from regularly occurring asymmetrical exchange in **Drosophila melanogaster**. *Genetics* **46**, 1687-1697 (1961).
- Kalisch W.-E. and B. Rasmuson : Changes of **zeste** phenotype induced by autosomal mutations in **Drosophila melanogaster**. *Hereditas* **78**, 97-104 (1974).
- Kambysellis M.P. : Comparative studies of oogenesis and egg morphology among species of the genus **Drosophila**. Univ. Texas Publ. **6818**, 71-92 (1968).
- Keller C. und H. Lüers : Röntgenstrahlendosis und Mutationsrate bei **Drosophila funebris**. *Biol. Zentralblatt* **57**, 288-292 (1937).
- King R.C. : Ovarian development in **Drosophila melanogaster**. Academic Press, NewYork, 1970 a.
- King R.C. : The meiotic behavior of the **Drosophila** oocyte. *Int. Rev. Cytology* **28**, 125-168 (1970 b).
- King R.C. , J.B. Darrow and N.W. Kaye : Studies on different classes of mutations induced by radiation of **Drosophila melanogaster** females. *Genetics* **41**, 890-900 (1956).
- King R.C., A.C. Robinson and R.F. Smith : Oogenesis in adult **Drosophila melanogaster**. *Growth* **20**, 121-157 (1956).
- Kobel H.R. and H. Gloor : **Drosophila** species: new mutants, **D. hydei**. Report of H. Gloor. *Drosophila Information Service* **47**, 47-52 (1971).
- Koch E.A., P.A. Smith and R.C. King : Variations in the radiosensitivity of oocyte chromosomes during meiosis in **Drosophila melanogaster**. *Chromosoma* **30**, 98-108 (1970).
- Laird C.D. : DNA of **Drosophila** chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* **7**, 177-204 (1973).
- Lea D.E. : Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press, Cambridge 1946.
- Lefevre G., Jr. : The relationship between genes and polytene chromosome bands. *Ann. Rev. Genet.* **8**, 51-62 (1974).
- Leigh B. : Radiation-induced loss of ring-X chromosomes in the germ cells of **Drosophila melanogaster** males. *Mutation Res.* **8**, 101-109 (1969).
- Leigh B. and F.H. Sobels : Induction by X-rays of isochromosomes in the germ cells of **Drosophila melanogaster** males. *Mutation Res.* **10**, 475-487 (1970).
- Leuthold U. : Einfluss der Geschlechtschromosomen auf die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Zelltypen von **Drosophila melanogaster**. *Mutation Res.* **14**, 65-81 (1972).
- Lindsley D.L., C.W. Edington and E.S. von Halle : The relation of the genetic constitution of **Drosophila** spermatozoa to their sensitivity to X-radiation. *Radiation Res.* **8**, 145 (1958).
- Lindsley D.L., C.W. Edington and E.S. von Halle : Sex-linked recessive lethals in **Drosophila** whose expression is suppressed by the Y chromosome. *Genetics* **45**, 1649-1670 (1960).
- Lindsley D.L. and E.H. Grell : Genetic variations of **Drosophila melanogaster**. Carnegie Inst. Wash. Publ. **627** (1968).

- Lucchesi J.C. : The nature of induced exchanges between the attached-X and Y chromosomes in **Drosophila melanogaster** females. *Genetics* **51**, 209-216 (1965).
- McCarron M., W. Gelbart and A. Chovnik : Intracistronic mapping of electrophoretic sites in **Drosophila melanogaster** : Fidelity of information transfer by gene conversion. *Genetics* **76**, 289-299 (1974).
- Meyer G.F. and W. Hennig : The nucleolus in primary spermatocytes of **Drosophila hydei**. *Chromosoma* **46**, 121-144 (1974).
- Morgan T.H., C.B. Bridges and J. Schultz : The constitution of the germinal material in relation to heredity. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* **29**, 352-359 (1930).
- Muller H.J. : The measurement of gene mutation rate in **Drosophila**, its high variability and its dependence on temperature. *Genetics* **13**, 279-357 (1928a).
- Muller H.J. : The problem of genic modification. *Verh. V. Int. Kongr. Vererbungswissenschaft.* In: *Z. Induktive Abstamm.- u. Vererbungslehre*, Suppl. **1**, 234-260 (1928b).
- Muller H.J. : The nature of genetic effects produced by radiation. In: A. Hollaender (ed.): *Radiation biology*, vol. I part 1, p. 351-373. McGraw-Hill, New York 1954.
- Olivieri G. and A. Olivieri : Evidence for the two-hit nature of X-ray induced crossing over in the centromeric region of **Drosophila** males. *Mutation Res.* **1**, 279-295 (1964).
- Parker D.R. : Dominant lethal mutation in irradiated oocytes. *Univ. Texas Publ.* **5914**, 113-127 (1959).
- Parker D.R. : On the nature of sensitivity changes in oocytes of **Drosophila melanogaster**. In: F.H. Sobels (ed.): *Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells*, p. 11-19. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, 1963.
- Parker D.R. : A survey of methods for the induction of aberrations in meiotic stages in **Drosophila** females and for observation of their disjunctional properties in the ensuing meiotic divisions. In: *Effects of radiation in meiotic systems*, p. 209-218. International Atomic Energy Agency, Vienna 1968.
- Parker D.R. : Heterologous interchange at meiosis in **Drosophila**. II. Some disjunctional consequences of interchange. *Mutation Res.* **7**, 393-407 (1969).
- Patterson J.T. and W.S. Stone : Evolution in the genus **Drosophila**. Macmillan, New York 1952.
- Perje A.M. : Genetic and cytological studies of **Drosophila funebris**, some sex linked mutations and their standard order. *Acta Zool.* **36**, 51-66 (1955).
- Rudkin G.T. : The relative mutabilities of DNA regions of the X chromosome of **Drosophila melanogaster**, *Genetics* **52**, 665-681 (1965).
- Sävhaugen R. : Cell stages and differential sensitivity to irradiation in males of **Drosophila melanogaster**. In: F.H. Sobels (ed.): *Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells*, p. 343-353. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1963.
- Schäfer U. and W. Kunz : Two separated nucleolus organizers on the **Drosophila hydei** Y chromosome. *Molec. gen. Genet.* **137**, 365-368 (1975).
- Schultz J. : X-ray effects on **Drosophila pseudoobscura**. *Genetics* **18**, 284-291 (1933).
- Schultz J. and H. Redfield : Interchromosomal effects on crossing over in **Drosophila**. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 175-197 (1951).
- Sobels F.H. : Radiosensitivity and repair in different germ cell stages of **Drosophila**. In: *Genetics today (Proc. XIth Int. Congr. Genet., The Hague 1963, S.J. Geerts, ed.)*, vol. 2, p. 235-255. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1965.

- Sorsa V., M.M. Green and W. Beermann : Cytogenetic fine structure and chromosomal localization of the **white** gene in **Drosophila melanogaster**. *Nature New Biology* **245**, 34-37 (1973).
- Spencer W.P. : Gene homologies and the mutants of **Drosophila hydei**. In : G.L. Jepsen, E. Mayr and G.G. Simpson (eds.) : *Genetics, paleontology and evolution*, p. 23-44. Princeton University Press, Princeton N.J. 1949.
- Spencer W.P. : Genetic studies on **Drosophila mulleri**. II. Linkage maps of the X and chromosome II with special reference to gene and chromosome homologies. *Univ. Texas Publ.* **5721**, 206-217 (1957).
- Spurway H. : The genetics and cytology of **Drosophila subobscura**. I. Element A. Sex linked mutants and their standard order. *J. Genet.* **46**, 268-286 (1945).
- Stern H. and Y. Hotta : DNA metabolism during pachytene in relation to crossing over. *Genetics* **78**, 227-235 (1974).
- Strickberger M.W. : *Genetics*. Macmillan, New York & Collier-Macmillan, London 1968.
- Sturtevant A.H. and E. Novitski : The homologies of the chromosome elements in the genus **Drosophila**. *Genetics* **26**, 517-541 (1941).
- Tartof K. : Redundant genes. *Ann. Rev. Genet.* **9**, 355-385 (1975).
- Throckmorton L.H. : The problem of phylogeny in the genus **Drosophila**. *Univ. Texas Publ.* **6205**, 207-343 (1962).
- Timoféeff-Ressovsky N.W. : Zur Frage der Beziehungen zwischen strahlenausgelösten Punkt- und Chromosomenmutationen bei **Drosophila**. *Chromosoma* **1**, 310-316 (1939).
- Traut H. : Dose dependency of the frequency of radiation-induced recessive sex-linked lethals in **Drosophila melanogaster**, with special consideration of the stage sensitivity of the irradiated germ cells. In : F.H. Sobels (ed.) : *Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells*, p. 359-374. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1963.
- Traut H. : The dose-dependence of X-chromosome loss and nondisjunction induced by X-rays in oocytes of **Drosophila melanogaster**. *Mutation Res.* **1**, 157-162 (1964).
- Wasserman M. : Cytological studies of the **repleta** group. *Univ. Texas Publ.* **5422**, 130-152 (1954).
- Wasserman M. : Cytological studies of the **repleta** group of the genus **Drosophila**. III. The **mercatorum** subgroup. *Univ. Texas Publ.* **6205**, 63-72 (1962a) — IV. The **hydei** subgroup. *Idem*, 73-84 (1962b). — V. The **mulleri** subgroup. *Idem*, 85-118 (1962c). — VI. The **fasciola** subgroup. *Idem*, 119-134 (1962d).
- Welshons W.J. and D.O. Keppy : Intragenic deletions and salivary band relationships in **Drosophila**. *Genetics* **80**, 143-155 (1975).
- Whitehouse H.L.K. : *Towards an understanding of the mechanism of heredity*, 3rd ed. Edward Arnold Ltd., London 1973.
- Wimber D.E. and D.M. Steffensen : Localization of gene function. *Ann. Rev. Genet.* **7**, 205-223 (1973).
- Würgler F.E. and U. Leuthold : Radiosensitivity of oocytes of **Drosophila**. II. Sensitivity of class-B oocytes of X/X and XY/XY females. *Intern. J. Radiation Biol.* **21**, 465-473 (1972).
- Yoon J.S. and M. Wheeler : Chromosome evolution. Repetitive euchromatic chromosomal segments in Hawaiian **Drosophila**. *Canad. J. Genet. Cytol.* **15**, 171-196 (1973).

Frei H., University of Geneva, Switzerland.
New white alleles by recombination in *Drosophila hydei*.

w^{iv} of *D. hydei* is a slightly ivory tinged mutant of the white locus. Only one coloured allele, w^{ak} , is known. Darker alleles (w^{hg} , w^{fr} and w^{gl}) are mutational derivatives of w^{iv} . They arose either spontaneously or in an X-irradiation experiment (w^{fr}) in attached-X chromosomes. After detachment, intragenic exchange properties of these secondary alleles were studied in w^{ak}/w^{hg} , w^{ak}/w^{fr} and w^{ak}/w^{gl} genotypes. Among the offspring of such compound females, wildtype recombinants were found as well as the reciprocal white-eyed exchange types (R). Furthermore, exceptional white-eyed recombinants (E) exhibiting the marker combination of the wildtype recombinants were found among the offspring of w^{ak}/w^{hg} and w^{ak}/w^{fr} . From females w^+/w^{hg} and w^+/w^{fr} , but not from w^+/w^{gl} , white-eyed recombinational types could be obtained (E^*), the direction of exchange being the same

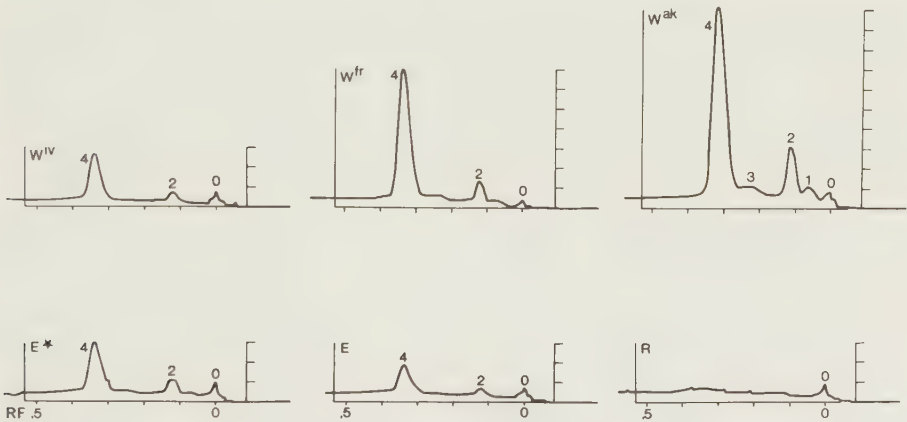


Figure : Pterin fluorescence patterns from two simultaneously prepared series of chromatographs.

Top row : original white alleles, w^{iv} , w^{fr} and w^{ak} .

Bottom row : white-eyed types from recombination experiments, E^* of w^{fr} , E of w^{fr} and R of w^{fr} .

0 = starting point, 1 = pterincarbonic acid, 2 = isoxanthopterin + xanthopterin and allied substances, 3 = yellow pterin and allied substances, 4 = mainly bipterin, admixture of 2-amino-4-hydroxypteridine.

The same intensity scale of arbitrary fluorescence units applies to the six examples shown.

as in the case of E-types. Recombinant males were individually crossed to attached-X females C(1)RM, $w^{iv}y^{lt}$, and of four different stocks thus established, male offspring was used for a chromatographic study of allele expression.

By thin layer chromatography of head extracts I examined the pattern and the relative amounts of fluorescent eye pigment components in R of w^{fr} , E and E* of w^{fr} , and in E* of w^{hg} . Fluorescence was induced by filtered UV at wavelength 365 m μ , and its intensity measured at different wavelengths of the visible spectrum on a Zeiss "Chromatogramm-Spectro-Photometer". In the examples illustrated, flies reared at 25°C were aged for 1 week and used when 7-10 d. old. Extracts of 20 ♂ heads in 0.1 ml of methanol/NH₃(25%)/H₂O (5:1:4) gave sufficient material for 2 chromatographs. Ascending chromatography on thin layer cellulose foils (Merck) was applied in one-dimensional runs of 8 hours in propanol/NH₃(25%)/H₂O (10:1:4). The chromatograph readings (Figure) were taken at wavelengths in the blue part around 440 m μ , from the starting point to about RF 0,5.

R of w^{fr} , which is a double mutant as shown by its separability by recombination into w^{ak} and w^{fr} , contains a minimum of fluorescent perins. By contrast, E and E* of w^{fr} contain relatively high amounts of, mainly, biopterin, isoxanthopterin and xanthopterin, thereby resembling rather closely the original w^{iv} allele. However, in 6 independent comparisons, E* showed a higher concentration than E of the substances mentioned, w^{iv} being intermediate in most of the cases. E* of w^{hg} (not shown in the Figure) produced chromatographs that were nearly empty, and similar in pattern to those from R of w^{fr} .

Considering that all the exceptions arose through crossing over, but were white-eyed instead of wildtype, it may be postulated that "incorrect" recombination has created new hypomorphic alleles. In line with this, they could be interpreted as more or less important deficiencies of the white gene with meiotic mispairing and unequal exchange at their origin. Alternatively, the w^{iv} -derivatives (w^{fr} and w^{hg}) might already be double mutants of white. In that case, the allelic crosses carried out would represent trifactorial exchange experiments, so that new sublocus combinations would be expected to appear, comprising from zero to three mutated sites.

Note : w^{gl} in this report is synonymous with w^{m1} , the latter symbol corresponding to definitive terminology (cf. Frei H. : Molec. gen. Genet. **142**, 105-117, 1975).

Supported by Fonds National Suisse de la recherche scientifique, grant 3.224.69

Schweizerische Gesellschaft für Vererbungsforschung

Zusammenfassungen der nicht ausführlich publizierten Referate,
die an der Jahresversammlung 1971 gehalten wurden.

Röntgeninduktion geschlechtsgekoppelter rezessiver Letalfaktoren und Mutationsrate bei *Drosophila hydei*¹

H. FREI

Laboratoire de Génétique animale et végétale, Université de Genève

Von Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, wissen wir um einen Zusammenhang zwischen Crossing-over und Ausbesserung strahleninduzierter Schäden in der DNS. Auch bei höheren Organismen sind Beziehungen zwischen diesen beiden Mechanismen nicht unwahrscheinlich: Watson (1969, 1971) diskutiert abweichendes Reparationsvermögen einer rekombinationsdefekten Mutante von *Drosophila melanogaster* in diesem Sinne. Vergleichende Mutationsexperimente ausgeführt am Wildtyp von *Drosophila hydei* sind von Interesse, da diese Art gegenüber *melanogaster* eine annähernd doppelt so lange genetische Karte des X-Chromosoms und wahrscheinlich auch der Autosomen besitzt (Spencer, 1949) und somit Unterschiede in Länge oder Struktur der Chromosomen, in ihrem Meioseverhalten oder im enzymatischen Rekombinationssystem angenommen werden können. Männchen des Wildstamms *Madeira* von *D. hydei* wurden zu Beginn ihrer fertilen Periode bestrahlt (Röntgenbestrahlung in Luft bei Zimmertemperatur, 60 kV, 2,5 mA, 180 oder 360 R/min), so dass in einem Teil der Keimzellen rezessive X-chromosomale Letalfaktoren induziert wurden, deren Nachweis mit einer Detektionsmethode erfolgte, die dem für *D. melanogaster* entwickelten CIB-Test (Muller, 1928) analog ist. Als nützlich zur Bestimmung der Mutationshäufigkeit erwies sich die Unterscheidung der verschiedenen strahlenempfindlichen Keimzellenstadien der Spermatogenese (Auerbach, 1954), da homologe Stadien für einen Mutabilitätsvergleich zwischen Arten erwünscht sind. Bestrahlung junger Spermien ergab Mutationsfrequenzen, die positiv korreliert sind mit den applizierten Strahlungs Dosen, nämlich 30 letale auf total 740 Testchromosomen bei 1500 R, 200/2470 bei 3000 R, 163/1563 bei 6000 R und 34/166 bei 12 000 R. Da in diesem Dosisbereich in erster Annäherung eine lineare Beziehung anzunehmen ist (Zimmer und Timoféeff, 1942), wurde die durchschnittliche Frequenzänderung pro 1000 R Dosisdifferenz als Mutabilitätsparameter errechnet: 2,48 %. Sie unterscheidet sich nur geringfügig von den auf vergleichbare Weise ermittelten Ergebnissen bei *D. melanogaster* (Traut, 1963; Zimmer und Timoféeff, 1942) und bei *D. funebris* (Keller und Lüers, 1937). Obwohl (1) diese zwei Arten und *D. hydei*, ihrer systematischen Stellung entsprechend, als genetisch recht verschieden zu betrachten sind und (2) für *melanogaster* und *hydei* die genetische Länge des X-Chromosoms ungleich ist, stimmt die Mutabilität in den drei Fällen doch annähernd überein, allerdings mit Beschränkung auf die Frequenz induzierter rezessiver Letalfaktoren des X-Chromosoms. Nicht ausgeschlossen sind andersartige Ergebnisse sowohl bei Anwendung weiterer Testkriterien als auch in bezug auf die spontane Mutationsrate.

AUERBACH C.: Z. ind. Abst. Vererbl. 86, 113–125 (1954).

KELLER C. und LÜERS H.: Biol. Zentralblatt 57, 288–292 (1937).

MULLER H.J.: Genetics 13, 279–357 (1928).

¹ Mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Gesuchs-Nr. 3.224.69.

- SPENCER W.P. in: JEPSEN G.L., MAYR E. and SIMPSON G.G. (eds.): Genetics, Paleontology and Evolution, p. 23-44. Princeton, New Jersey, 1949.
- TRAUT H. in: SOBELS F.H. (ed.): Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells, p. 359-374. New York 1963.
- WATSON W.A.F.: Mut. Res. 8, 91-100 (1969).
- WATSON W.A.F.: 2nd Europ. Drosophila Conf. Abstr. (1971).
- ZIMMER K.G. und TIMOFÉEFF-RESSOVSKY N.W.: Z. ind. Abst. Vererbl. 80, 353-372 (1942).

**Strahlenempfindlichkeit der meiotischen Prophase-Stadien
in der Oogenese von *Drosophila hydei***

H. FREI

Laboratoire de Génétique animale et végétale, Université de Genève

Bestrahlung fortpflanzungsreifer *Drosophila*-Weibchen setzt genetische Schäden in den Keimzellen. Abhängig vom Entwicklungszustand im Zeitpunkt der Bestrahlung zeigen die zukünftigen Eizellen sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedliche Reaktionsnormen (King et al., 1956; Parker, 1968; Koch et al., 1970). King (1970) unterteilt den Ablauf der ersten meiotischen Prophase in drei Perioden mit korreliertem Wechsel von Kernmorphologie und Strahlensensibilität während der Oogenese. Hohe Mutationsraten sind bei reifen Oocyten zu verzeichnen. Deutlich resistenter sind die vorangehend jüngeren Stadien. Bei Bestrahlung früher Prophasestadien, ungefähr entsprechend der chromosomalen Synapsis, sinkt die experimentelle Mutationsrate nahezu auf den Kontrollwert.

Die stadienspezifische Strahlenempfindlichkeit lässt sich bei *Drosophila hydei* anhand des induzierten Trennens von Attached-X-Chromosomen untersuchen. In getrennten Versuchsserien wurden Weibchen mit Attached-X-Chromosomen (Gregg, 1957) im Alter von etwa 3, 6, 7, 10 und 14 Tagen bestrahlt (Gamma-Strahlung einer Co⁶⁰-Quelle, Bestrahlung in Luft bei Zimmertemperatur: 1500 rad in etwa 8 min, Filtrierung durch 1 cm Plexiglas direkt vor dem Objekt) und anschliessend in Massenzucht angesetzt. Die getrennte Analyse der Nachkommenschaften aus den aufeinanderfolgenden täglichen Gelegen in jeder Serie lässt zwei Hauptphasen erkennen: In reifen Oocyten und in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien der Oogenese wird Chromosomentrennung häufiger induziert als in den jungen Stadien, die nach Bestrahlung noch 7 Tage oder länger zur Ausreifung benötigen. Die in allen Versuchsserien ähnlich ausgefallenen Resultate lassen annehmen, dass für die Auslösung der Chromosomentrennung zwei sensible Phasen bestehen, die Beginn und Ende der empfindlicheren Hauptperiode markieren, und dass eine strahlenresistentere Entwicklungsstufe dazwischenliegt. Beispielsweise war nach Bestrahlung einwöchiger Weibchen die Trennungshäufigkeit in der ersten Tagesbrut hoch; sie fiel am zweiten Tag auf ein relatives Minimum und nahm darauf stetig zu bis zum zweiten Maximum am fünften Tag. Drei Tage später war das tiefe Niveau erreicht, das die unempfindliche Hauptphase kennzeichnet. Die Altersstruktur der bestrahlten Mutterpopulation hat modifizierenden Einfluss auf dieses Brutmuster: Das zweite Maximum war wenig ausgeprägt nach Bestrahlung junger Weibchen. Andererseits erschien das Sensibilitätsminimum etwas verspätet in den Versuchen mit 10 oder 14 Tage alten Müttern; auch vollzog sich hier der Abfall vom zweiten Gipfel zum tiefen Niveau gleitender als in den Experimenten mit jüngeren Müttern.

Eine mehrtägige sensible Hauptperiode, während der sich ein Abfall vom 1. zum 2. Experimental-Tag manifestiert, war auf Grund der Befunde über strahleninduziertes Trennen von Attached-X-Chromosomen bei *Drosophila melanogaster* (Mainx, 1940; Abrahamson, 1961; Parker, 1963) zu erwarten. Das Resultat steht aber in einem gewissen Gegensatz zu Kings Interpretation der differentiellen Strahlensensibilität von Oocyten, da sich mit der hier gewählten Versuchsanordnung ein mittleres oder junges Oogenese-Stadium als erhöht empfindlich erwies.

ABRAHAMSON S.: Int. J. Rad. Biol. 4, 113–125 (1961).

GREGG T.G.: Univ. Texas Publ. 5721, 238–245 (1957).

KING R.C.: Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York-London 1970.

- KING R.C., DARROW J.B. and KAYE N.W.: *Genetics* 41, 890-900 (1956).
- KOCH E.A., SMITH P.A. and KING R.C.: *Chromosoma* 30, 98-108 (1970).
- MAINX F.: *Z. Ind. Abst. Vererbl.* 78, 238-245 (1940).
- PARKER D.R.: in: *Repair from Genetic Radiation Damage* (SOBELS F.H., ed.). Pergamon Press, Oxford-New York 1963, p. 11-19.
- PARKER D.R.: in: *Effects of Radiation in Meiotic Systems*. International Atomic Energy Agency, Wien 1968, p. 209-218.

Mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung; Gesuchs-Nr. 3.224.69.

RADIATION-INDUCED DOMINANT LETHALITY IN OOCYTES OF *DROSOPHILA HYDEI*, WITH EMPHASIS ON THE DIFFERENTIAL SENSITIVITY OF THE IMMATURE STAGES IN CLASS B

HANSJÖRG FREI

Laboratoire de Génétique Animale et Végétale, 154 route de Malagnou, CH-1224 Genève (Switzerland)

(Received November 10th, 1973)

(Revision received April 9th, 1974)

SUMMARY

A brood-pattern analysis of radiation-induced damage in the oocytes of attached-X females of *Drosophila hydei* was carried out by the dominant lethal test. The methods used allow a refined description of the differential radiosensitivity of oocytes with respect to the stage succession in the oogenesis of this species. As in *D. melanogaster*, three levels of sensitivity, corresponding to classes A, B and C of oocytes, showed up. The differences in sensitivity led to clear-cut steps in the brood pattern of lethal frequencies, whereby class B is distinguished by an intermediate yield of induced damage.

Eggs deposited on the first day after irradiation are not in every instance a pure sample of irradiated stage-14 oocytes, but may contain an admixture derived from less sensitive vitellogenic stages. For the previtellogenic stages, belonging to class B, it is proposed that it is the youngest group which exhibits the highest radiosensitivity. This agrees with earlier results from detachment of attached-X chromosomes in *D. hydei*.

The brood patterns of lethal frequencies were not identical, but similar, when a distinction was made between induced early and late embryonic lethality. On certain assumptions, this is interpreted to mean that the stage-dependent differences in sensitivity observed are due to genetic causes, *i.e.*, are correlated with changes in the state of the oocyte nucleus during oogenesis.

INTRODUCTION

Differential radiosensitivity of developing oocytes in *Drosophila melanogaster* is correlated with morphological changes observed in the meiotic prophase nuclei during oogenesis. According to KING *et al.*⁷, mature oocytes of stage 14 show the highest mutation rate as revealed by dominant and recessive lethal tests, and by scoring for induced chromosome loss. Younger oocytes are markedly less sensitive and may represent diplotene stages as discussed by KING⁶. KING tentatively explains the relative resistance of still younger stages, whose nuclei contain synaptonemal complexes⁸, by

a more efficient repair of induced genetic damage. The three levels of sensitivity (A, B and C in KING's nomenclature⁶) were expected to show up, when the mutability of female germ-cell stages was investigated in *D. hydei*, by an analysis of brood-specific detachment frequencies of attached-X chromosomes¹. However, the results indicated that, in a rather early prophase stage, the mutational event occurred as frequently as in the mature oocytes, the two sensitive stages being separated by more resistant ones. The outcome, at variance with the ideas cited above, could be due either to the specific architecture of the attached-X chromosome used in the experiments with *D. hydei*, or to the detachment criterion as such. Hence, an experiment was needed in which these factors play a role of minor importance. The induction of dominant lethals, as far as is known, should fit the requirements.

MATERIAL AND METHODS

About 120 virgin females, carrying the C(1)RM chromosome of GREGG⁴ and a normal Y, were irradiated with 1500 rad of γ -rays of ⁶⁰Co, administered within 8.04 min in air at room temperature, filtered through a 1-cm plexiglass layer placed just above the radiation chamber. After irradiation the females were kept isolated from males on ordinary culture medium and mated in mass, two hours later, to an approximately equal number of *sc*/Y males. Copulations took place immediately, since the animals had been aged during one week after eclosion and thus had become fully mature for reproduction. To collect eggs, the flies were given a special food, composed of dried yeast, brown sugar, agar, and dark beer instead of water, onto which a thin layer of live yeast was plated. Following irradiation at noon, the first egg-laying lasted from 14.00 h to 8.00 h of the next day. Afterwards, a regular scheme was applied daily, up to the 10th day after irradiation, with the flies on ordinary culture medium from 8.00 h to 16.00 h and on special medium to lay eggs, from 16.00 h to 8.00 h of the following day. The alternation of food quality protects against egg retention, which we observe sometimes when the dark beer food is given continuously. The collecting periods were adjusted to the diurnal rhythm in egg-laying activity of *D. hydei*, which reaches its maximum in the early evening. Newly laid eggs were transferred manually on to 2% agar in petri dishes and incubated for two days. The eggs were then classified into (1) "white lethals", indicating unfertilized eggs or arrest of development at an early embryonic stage, (2) "brown lethals", indicating death around organogenesis^{3,14}, and (3) empty chorions of surviving progeny. A control was run in parallel, with some 80 parental pairs under otherwise identical conditions. The temperature was kept at $25 \pm 1^\circ$ for flies and incubated embryos.

A further experiment was based on egg collection from individual attached-X females, aged for 14 days. After irradiation with 1500 rad, each female was mated to two males in an empty tube. In every case, the occurrence of copulation was visually checked. Subsequently, dark beer food was given on interchangeable caps which were replaced periodically. The first egg batch of each female was collected and screened for dominant lethality. Batches leading to hatched offspring or recognizable stages of arrested embryos were considered as fully fertilized, unless otherwise stated in the text. Parallel controls were run under the same conditions. Egg collection was continued beyond the first batch, with 5 selected control and experimental females each, which showed an optimal and regular egg production of approx. 80 eggs per day, *i.e.*

about 2 eggs per ovariole. From these animals, all the eggs deposited during one week were collected in 12 subsequent, variably spaced collecting periods. For each egg sample thus obtained, the incidence of failure to hatch was recorded.

RESULTS

The results from the mass mating experiment are set out in Fig. 1. The graphs are based on the total lethality observed, without distinction of the main lethal phases during embryogenesis. In the control series about 25–30% of the eggs did not hatch, evidently owing to the exceptional maternal genotype, and to a lesser extent, most probably, in consequence of leaky fertilization. Considering that under certain conditions *D. hydei* may lay numerous unfertilized eggs, the comparatively large fraction which failed to hatch in the first sample may mark insufficient insemination. Possibly, improvement of fertilization led to the slight decline in hatching failure observed from days 2–10. In the experimental series, the maximal frequency of unhatched eggs was found on the first day, followed by a sharp decrease on the second and a minimum on the third day. An increase was noted on day 4, continuing to a second maximum on day 5, whereupon the proportion of unhatched eggs declined towards the control level, though not completely. The effectiveness of radiation in inducing lethal damage was calculated from the daily records in both series by the formula $L = 1 - p_e/p_c$, where p_e and p_c are, respectively, the percentages of survivors in the experimental and in the control groups of each day.

The dominant lethal effect of roughly 70% in the oocytes collected on the first day, was never reached again on subsequent days. Oocytes collected on day 5 had suffered only half as much from the treatment. An inspection for statistical validity of

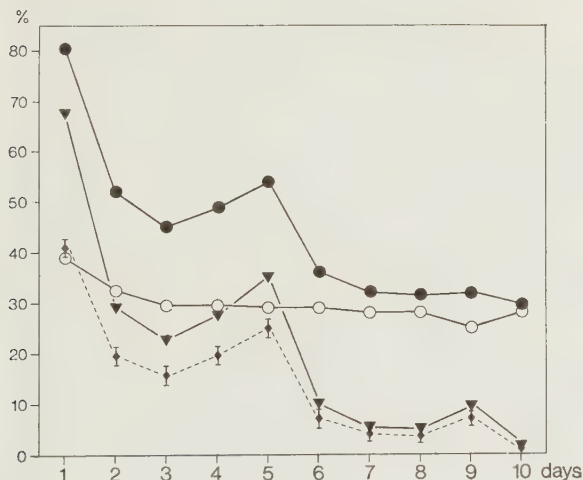


Fig. 1. Brood-pattern analysis of radiation-induced dominant lethality in oocytes of attached-X females, 7 days old. The results from eggs collected in mass at daily intervals are represented for a period of 10 days after irradiation. Percentages of unhatched eggs from females irradiated with 1500 rad of γ -rays (full circles) and from untreated females (open circles) were used to estimate the frequency of embryonic death from damage induced in the irradiated oocytes (triangles). Rhombic signs, connected by dashed lines, represent the difference in survival frequency between the control and the irradiation series, with indication of the standard error.

differences between broods is more accurately done on the differences in survival ($\hat{p}_c - \hat{p}_e$) calculated for each day, since reliable approximations to estimate their standard errors can be used¹³. The sudden decreases in induced mortality from broods 1 to 2 and from broods 5 to 6 are significant, whereas the more continuous changes from broods 2 to 5 led to a heterogeneity in that group, owing to the discrepancy between broods 3 and 5.

According to the argument of WÜGLER *et al.*¹⁵, it was felt that late lethality might indicate the induction not only of genetic lesions on the chromosomes of the oocyte nucleus, but also of additional lesions on other targets, for example in the cytoplasm. First, the induction means per oocyte for early expressed (L_q) and total lethal damage (L_t) were calculated as the negative natural logarithms of the corresponding survival frequencies⁹ (Table I). The mean value for the induction of late lethality was then given by the difference $L_t - L_q$. Since the means for early and late lethality show similar brood patterns, it seems to make only little difference, if any, what kind of embryonic dominant lethal effect is used to compare the genetic sensitivity to irradiation of the different stages in oocyte development.

Because unfertilized eggs might have been confounded with early lethal embryos, one could argue that the relatively high percentage of hatching failure observed on days 4 and 5 may reflect an occasionally insufficient fertilization of the experimental egg samples. However, such a disturbance should have an influence on the percentage of late lethals, inverse to that observed, *i.e.* the frequency of "brown" embryos should be depressed rather than increased on these days. The parallel shifts which show up for early and late lethality are therefore more reasonably interpreted as due to concordant changes in susceptibility for genetic damage manifested at early or late stages of embryogenesis.

First eggs deposited by irradiated females may show a considerable variability with respect to hatching failure. This heterogeneity between batches collected from different individuals may relate to leaky fertilization and to stage mixture². The latter cause of error was considered to become minor if first eggs were sampled from relatively old virgin females, *i.e.* those aged for 14 days. In such females, ordinarily, a large number of mature oocytes is present, each ovariole containing two or even three. If not more than 80 eggs, roughly corresponding to two eggs per ovariole⁵, are collected in a first batch from each female, the material obtained should be homogeneous and represent irradiated stage-14 oocytes without contamination by eggs deriving from oocytes that were younger than stage 14 at the time of irradiation. Furthermore, if the collection is not protracted beyond the first 24 h after irradiation, an admixture of eggs irradiated as oocytes of stage 7, or younger, becomes improbable, since these stages need approximately 48 h, or longer, to develop into mature oocytes⁵.

An experiment was set up with 15 control and 25 irradiated females, 14 days old. Nine of them (control, 3; experimental, 6) laid more than 10 eggs during the first collecting period, 0–12 h after irradiation. Another 16 batches of first eggs (control, 6; experimental, 10) were obtained from the subsequent sampling period, 12–24 h. The results are summarized in Table II. One of the control batches is not included because insufficient fertilization was obvious. The remaining 8 showed a hatching failure of 31.5% with no significant heterogeneity between individual samples. In the experimental group, 87% of the eggs failed to hatch. Thus, the induced dominant lethality for irradiated mature oocytes, corrected for the control value of hatching failure, is

TABLE I

FREQUENCIES OF SURVIVAL (*p*) AND EARLY (*q*) OR LATE MORTALITY (*r*) IN THE EMBRYONIC PROGENIES OF UNTREATED OR IRRADIATED ATTACHED-X FEMALES, 7 DAYS OLD

The total dominant lethal effect (*L_t*) varies among the samples from successive daily broods and indicates that the treatment was unequally effective in inducing lethal damage in the different stages of oocyte development. Similar trends were found in the daily changes of both the early (*L_q*) and the late lethal effects (*L_r*). In the section with low total effects, namely from days 6 to 10, trend calculations are considered to be meaningless on statistical grounds.

Day	Control		Experiment		Dominant lethal effects (mean values per oocyte)				Trends	
	Total number	Hatched %	"White" lethals %	"Brown" lethals %	Total	Early	Late	$L_t = L_e + L_r$	<i>L_q</i>	<i>L_r</i>
		<i>p_c</i>	<i>q_c</i>	<i>r_c</i>	Total number	<i>p_e</i>	<i>q_e</i>	<i>r_e</i>	$L_q = -\ln \frac{p_e}{p_c}$	$L_r = -\ln \frac{r_e}{r_c}$
1	936	60.9	39.1	0.0	950	19.7	68.0	12.3	0.64	0.49
2	1084	67.5	31.6	0.9	1157	48.0	46.7	5.3	0.25	0.09
3	1487	70.6	28.7	0.7	1375	54.8	39.8	5.4	0.17	0.08
4	1001	70.4	28.9	0.7	1359	51.0	38.7	10.3	0.15	0.17
5	979	70.8	28.5	0.7	1153	46.0	44.0	10.0	0.25	0.18
6	1210	71.1	28.2	0.7	1497	64.1	31.8	4.1	0.05	0.05
7	1454	72.2	26.1	1.7	1642	68.1	29.4	2.5	0.06	
8	1840	72.1	27.2	0.7	1759	68.5	28.8	2.7	0.05	
9	1622	74.9	23.5	1.6	2661	67.8	28.8	3.4	0.10	
10	1617	71.8	26.8	1.4	3280	70.6	27.0	2.4	0.02	

TABLE II

FREQUENCY OF HATCHING FAILURE OF FIRST EGGS DEPOSITED BY 14-DAY-OLD ATTACHED-X FEMALES

Batches of first eggs were obtained from individuals in two successive sampling periods, halving the first 24 h after irradiation with 1500 rad of γ -rays. The mean batch size is given as eggs per female, with its range in italics. Each sampling group was subject to an analysis of heterogeneity between batches with respect to hatching failure. Significance at the 5% level for the χ^2 values in the contingency tests is indicated by asterisks.

	<i>Control</i>	<i>Experiment</i>		
	<i>0-12 and 12-24 h</i>	<i>0-12 h</i>	<i>12-24 h</i>	<i>Total</i>
Females tested	8	6	10	16
Eggs/female	22..56.8..95	12..31.8..55	22..48.4..80	12..42.2..80
Total eggs	454	191	484	675
Hatching failure	31.5%	86.9%	87.2%	87.1%
χ^2	3.71	3.69	21.57*	25.21*

calculated as 81% in this experiment. This value is over 10% higher than that of 67.5% found in the mass-mating experiment for the egg sample from the first day. The discrepancy is consistent and not solely attributable to the somewhat different values of hatching failure in the control groups of the two experiments. It may be concluded, therefore, that eggs collected on the first day after irradiation do not represent a pure sample of fully mature terminal oocytes, but usually contain an admixture of eggs which at the time of irradiation were in a submature, less radiosensitive stage of oogenesis.

In the mass-mating experiment, the admixture could have been more important since the females were only one week old and may have accumulated fewer mature oocytes than the 14-day-old females tested individually. However, a heterogeneity in hatching failure was also recorded among egg batches of irradiated 14-day-old females. The χ^2 contingency test for heterogeneity shows significance at the 5% level of probability, attributable to three exceptional batches from the second collecting period; one of them most likely with insufficient fertilization, but two others also, with a survival of 24% (from 112 eggs) contrasting with the 11.5% (from 504 eggs) of survival in the remaining 13 batches. This may be taken as a further indication that within 24 h after irradiation, a type of oocyte reaches maturity that does not belong to the most radiosensitive stage 14 oocytes.

A graphical method (Fig. 2) has been chosen to demonstrate the relationship between oogenesis and the brood pattern of dominant lethality. Eggs were collected from 5 control and experimental females each 14 days old at the start of the experiment. The number of eggs deposited within one week was taken as the 100% abscissa value, corresponding to 2990 and 2802 eggs, respectively. For each of the 12 contiguous periods of egg collection, the value of hatching failure is given by the ordinate, the abscissal width relating to the fraction of eggs collected in that interval. For the experimental group, to show individual variability, the results from single egg batches are represented in an analogous manner, with the total number of eggs laid by each female as the individual 100% reference. Owing to an accidental manipulation, a control value for hatching failure is lacking in period 8, and the number of eggs deposited had to be estimated.

In the total score from the irradiated group, two separate blocks of eggs showed a significantly high incidence of hatching failure above the control level (Table III).

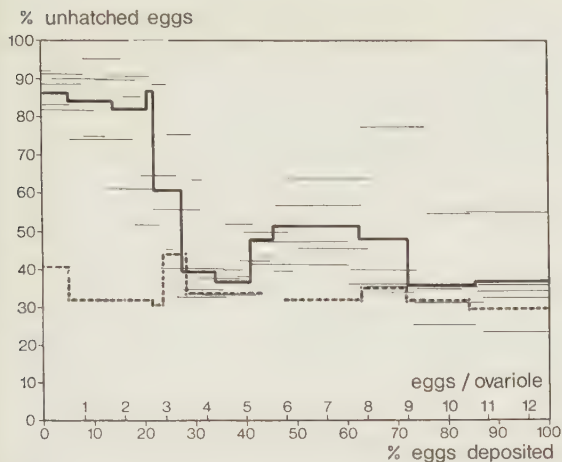


Fig. 2. Hatching failure of periodically collected eggs from attached-X females, 14 days old at the start of the experiment. The total of eggs produced within a week by the control group and the females irradiated with 1500 rad of γ -rays was taken as the 100% abscissal value, respectively. It is estimated that this value corresponds to an average production of 12–13 eggs per ovariole. Thin horizontal bars indicate the results from separately analyzed egg batches of 5 irradiated individuals. They were pooled for each collection period, as shown by the continuous heavy line. The dashed line represents pooled data from 5 control females. The underlying results are set out in Table III.

In the first 22% of eggs collected, this value was between 80 and 90%. As stated above, such a value is characteristically found for irradiated mature oocytes of 14-day-old females. In turn, the eggs collected in periods 6 and 7 (indicated between 27.2 and 40.8% on the abscissal scale in Fig. 2) showed a survival close to that of the control. The small differences in hatching failure are not statistically significant. A significant difference in hatching failure was again found in period 9, which was a relatively long sampling period of 24 h, comprising the egg fraction between 45.5 and 62.8% on the abscissa in Fig. 2. A concordance with the mass-mating experiment thereby showed up, in so far as this period, representing egg collection 3.5–4.5 days after irradiation, revealed a hatching failure somewhat higher than 50%, which contrasts markedly with lower values found in preceding samples, *i.e.* mainly those of periods 6 and 7. Nonsignificant, small differences in hatching failure between the experimental and the control series were found again for the final periods in the experiment, but any conclusion about them must be tentative because of the considerable heterogeneity existing between individual egg samples.

According to KAMBYSELLIS⁵, the number of ovarioles per ovary is about 23 in *D. hydei*. Counts made on a few dissected females of the attached-X stock used agree with this number. Thus, the total of 5792 eggs, deposited altogether by the 10 females tested, would correspond to a production within the whole experimental period of approx. 12 to 13 eggs per ovariole. In Fig. 2, every additional 8% of eggs deposited, on an average represents a further generation of eggs released from the ovarioles. An inspection for the ovarian state in females of a dissection control showed that an ovariole contained 8 to 9 oocytes in the vitellarium, *i.e.* about 2 to 3 oocytes of stage 14 or 13, 1 to 2 younger vitellogenic stages, and 4 to 5 previtellogenic stages. The interpretation, although approximate, would be that the eggs collected during periods 6 and 7,

TABLE III

FREQUENCIES OF HATCHING FAILURE (q) OF EGGS COLLECTED IN 12 SAMPLING PERIODS FROM UNTREATED (c) AND IRRADIATED (e) ATTACHED-X FEMALES, 14 DAYS OLD AT THE TIME OF IRRADIATION

The standard errors (SE) were calculated (SNEDECOR *et al.*¹³) with a correction for variability in individual batch size and heterogeneity in hatching failure. Differences between control and experiment were tested by the normal deviate (ND).

Collecting period			Control			Experiment			Difference	
No.	Time		Eggs	Egg fraction	$q_c \pm SE$	Eggs	Egg fraction	$q_e \pm SE$	$(q_e - q_c) \pm SE$	ND
1	0 -	12 h	149	0-5.0%	40.9 $\pm$ 3.0%	144	0-5.1%	86.1 $\pm$ 2.9%	45.2 $\pm$ 4.2%	10.77 ^d
2	12 h-	24 h	322	5.0-15.8%	32.0 $\pm$ 2.7%	249	5.1-14.0%	83.9 $\pm$ 4.0%	51.9 $\pm$ 4.8%	10.77 ^d
3	1 day	0 h-1 day	171	15.8-21.5%	32.2 $\pm$ 3.0%	183	14.0-20.5%	81.8 $\pm$ 10.0 ^a	49.6 $\pm$ 11.1%	4.47 ^d
4	1 day	5 h-1 day	55	21.5-23.3%	30.9 $\pm$ 3.7%	38	20.5-21.9%	86.8 $\pm$ 1.9%	55.9 $\pm$ 4.2%	13.48 ^d
5	1 day	12 h-2 days	135	23.3-27.8%	43.7 $\pm$ 7.2%	150	21.9-27.2%	60.7 $\pm$ 4.4%	17.0 $\pm$ 8.5%	2.01 ^e
6	2 days	1 h-2 days	296	27.8-37.7%	33.4 $\pm$ 3.9%	183	27.2-33.8%	39.3 $\pm$ 2.5%	5.9 $\pm$ 4.6%	1.27
7	2 days, 13 h-3 days	2 h	166	37.7-43.3%	33.1 $\pm$ 4.9%	195	33.8-40.8%	36.4 $\pm$ 1.9%	3.3 $\pm$ 5.2%	0.63
8	3 days	2 h-3 days	122 ^b	43.3-47.4% ^b		133	40.8-45.5%	47.4 $\pm$ 2.4%		
9	3 days	13 h-4 days	455	47.4-62.6%	32.3 $\pm$ 1.8%	484	45.5-62.8%	51.2 $\pm$ 4.1%	18.9 $\pm$ 4.5%	4.22 ^d
10	4 days	13 h-5 days	267	62.6-71.5%	35.2 $\pm$ 1.6%	262	62.8-72.1%	48.1 $\pm$ 10.7% ^c	12.9 $\pm$ 10.8% ^c	1.19 ^c
11	5 days	5 h-6 days	376	71.5-84.1%	31.1 $\pm$ 2.0%	373	72.1-85.4%	35.4 $\pm$ 3.7%	4.3 $\pm$ 4.2%	1.02
12	6 days	0 h-7 days	476	84.1-100%	29.2 $\pm$ 0.7%	408	85.4-100%	36.8 $\pm$ 5.5%	7.6 $\pm$ 5.5%	1.37

^a An unfertilized batch of 35 eggs is not included in the calculations.

^b Observation missing; estimations from fecundity of control and experimental females in the periods 7, 8, 9.

^c A batch of 71 eggs with probable incomplete fertilization was not excluded from the calculations.

^d Significance $P < 0.01$.

^e Significance $P < 0.05$.

showing a low incidence of hatching failure, derived from oocytes irradiated as late previtellogenic, perhaps also as early vitellogenic, stages. Younger previtellogenic stages, *e.g.* those sampled in period 9, would be characterized by a more marked susceptibility for induced lethal damage.

DISCUSSION

Oogenesis in *D. hydei*⁵ proceeds at a slower rate than in *D. melanogaster*, but the brood pattern appears interpretable in terms of the radiosensitivity classes defined for *D. melanogaster*. Eggs collected on the first day would mainly reflect the high sensitivity of stage 14 oocytes. From days 2 to 5, the previtellogenic stages, corresponding to class-B oocytes, would have reached maturity. Those stages that represent class C would not be distinguishable here, because of the relative radioresistance common to them and the younger stages, *i.e.* the cystocytes next in line and the oogonia. Thus, the experiments reported are consistent with the earlier findings in *D. melanogaster*⁶⁻⁸.

For precision, it should be noted that eggs collected on the first day after irradiation do not in every instance represent a homogeneous group of fully mature oocytes with the highest susceptibility for induced lethal damage. Dependent on the abundance of mature oocytes stocked in the ovarioles, females lay eggs irradiated as mature or submature oocytes in variable proportions. From the present experiments, it cannot be decided whether there is any relation to the differential radiosensitivity of "older" and "younger" stage 14 oocytes, as reported for *D. melanogaster*^{10,16}. More likely in *D. hydei*, an admixture of younger stages occurs, concerning oocytes irradiated during vitellogenesis. Joint deposition on the first day of eggs derived from irradiated previtellogenic stages seems less probable considering the time they require to become mature⁵. As an interpretation of the brood pattern obtained, it is proposed that the bulk of the more advanced previtellogenic stages, *e.g.* stage 7, reaches maturity 2 to 3 days after irradiation, leading to a pronounced depression in the incidence of induced dominant lethality. The subsequent stages of class-B oocytes appear increasingly more sensitive, the younger they are, as inferred from a peak in dominant lethality that occurred on day 5. On the time scale this is coincident with a maximal frequency of detachments of attached-X chromosomes generally scored in the progeny from the fifth or sixth day in comparable experimental approaches¹.

In *D. melanogaster* irradiation with 3000 R or more destroys to a large extent a class of oocytes somewhat younger than stage 7 (refs. 11, 14). Exposure to lower dosages, however, would permit a certain fraction of the younger type to complete oogenesis. Although in *D. melanogaster* the frequency of detachments does not discriminate between the two classes¹¹, the situation in *D. hydei* is probably different; hence it permits the demonstration of differential sensitivity among stages of class B. A refined brood-pattern analysis of induced detachments in *D. melanogaster* is reported by RINEHART *et al.*¹². The methods used by these authors imply that class-B oocytes and younger stages have given rise to adult progeny. In line with this, detachments were more frequent in the earliest two of 10 successive broods, distinguishing class B from the less sensitive class C oocytes. Although the speedy development of oocytes in this species may affect the resolution power of the brooding technique, an interesting trend appears in the results presented. Clustered recovery of detachments in progenies of single females seems more frequently to involve the second brood (days 3 and 4)

than the first. Since clustering appears not to be attributable to a common origin by cell-lineage, one can speculate that it is due to differences in the underlying material, for instance a difference in mutability traits among class-B oocytes. The hypothesis, however, presupposes that some egg chambers younger than stage 7 have escaped the killing effect brought about by the irradiation with 3000 R.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to thank Prof. H. J. GLOOR for his encouragement and for the careful revision of the manuscript. The irradiations were performed at the Centre de Radiothérapie, Hôpital cantonal de Genève, and I am indebted to Prof. J.-P. PAUNIER and to Miss M. BERNEGGER for providing the facilities. The technical assistance of Miss E. PASTORS and Mr. D. BRANDT is gratefully acknowledged.

This work received support from the Fonds national suisse de la recherche scientifique (crédit no. 3.224.69).

REFERENCES

- 1 FREI, H., Strahlenempfindlichkeit der meiotischen Prophase-Stadien in der Oogenese von *Drosophila hydei*, *Arch. Genet.*, 46 (1973) Abstr. 63-64.
- 2 FREI, H., unpublished data.
- 3 FRITZ-NIGGLI, H., *Strahlenbiologie, Grundlagen und Ergebnisse*, Thieme, Stuttgart, 1959.
- 4 GREGG, T. G., The production of attached-X chromosomes in *Drosophila hydei*, *Univ. Texas Publ.*, 5721 (1957) 238-245.
- 5 KAMBYSELLIS, M. P., Comparative studies of oogenesis and egg morphology among species of the genus *Drosophila*, *Univ. Texas Publ.*, 6818 (1968) 71-92.
- 6 KING, R. C., *Ovarian Development in Drosophila melanogaster*, Academic Press, New York, 1970.
- 7 KING, R. C., J. B. DARROW AND N. W. KAYE, Studies on different classes of mutations induced by radiation of *Drosophila melanogaster* females, *Genetics*, 41 (1956) 890-900.
- 8 KOCH, E. A., P. A. SMITH AND R. C. KING, Variations in the radiosensitivity of oocyte chromosomes during meiosis in *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma*, 30 (1970) 98-108.
- 9 LEA, D. E., *Actions of Radiations on Living Cells*, Cambridge University Press, Cambridge, 1946.
- 10 OSGOOD, C., AND S. ZIMMERING, Measurement of radiation-induced dominant lethals in stage-14 oocytes of *Drosophila*, *Mutation Res.*, 15 (1972) 355-357.
- 11 PARKER, D. R., Dominant lethal mutation in irradiated oocytes, *Univ. Texas Publ.*, 5914 (1959) 113-127.
- 12 RINEHART, R. R., AND F. J. RATTY, X-ray-induced multiple aberrations among oocytes of *Drosophila melanogaster*, *Mutation Res.*, 7 (1969) 122-125.
- 13 SNEDECOR, G. W., AND W. G. COCHRAN, *Statistical Methods*, 6th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1967.
- 14 WÜRLER, F. E., AND U. LEUTHOLD, Radiosensitivity of oocytes of *Drosophila*, II. Sensitivity of class-B oocytes of X/X and XY/XY females, *Intern. J. Radiation Biol.*, 21 (1972) 465-473.
- 15 WÜRLER, F. E., U. LEUTHOLD, U. GRAF AND H. ULRICH, Radiosensitivity of oocytes of *Drosophila*, III. Sensitivity of class-B oocytes of XX/O and X/X females, *Intern. J. Radiation Biol.*, 22 (1972) 367-377.
- 16 ZIMMERING, S., AND J. SCOTT, Measurements of X-ray induced mutational damage in stage-14 oocytes of *Drosophila*, *Mutation Res.*, 6 (1968) 179-180.

**Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der Spermatogenese
von *Drosophila hydei*, Letalraten und die Bedeutung
der arteigenen genetischen Organisation**

HANSJÖRG FREI

Laboratoire de Génétique animale et végétale, Université de Genève

Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der Spermatogenese von *Drosophila hydei*, Letalraten und die Bedeutung der arteigenen genetischen Organisation

HANSJÖRG FREI

Laboratoire de Génétique animale et végétale, Université de Genève

Abstract

Differential radiosensitivity of the germ cells in Drosophila hydei males, lethal rates and the relevance of the species-specific genetic organization

In the genus *Drosophila*, numerous species have evolved in such a way that interspecific differences may be found at any imaginable level of the genetic organization. The literature reports divergences in the chromosome sets, in the gene sequences, and in the length of recombination maps of corresponding chromosomal elements. This investigation aimed at gathering data in *Drosophila hydei*, concerning mutagenesis. Such data, in comparison with existing data from other species, in particular *Drosophila melanogaster*, were expected to throw light upon the bearing which a specific type of genetic organization has on experimental manipulations of the genome.

A brood pattern method has been devised for *D. hydei*, which allows to assess the mutagenic action of X-rays on the various stages of spermatogenesis. Male germ cell development in *D. hydei* was found to require twice as much time as in *D. melanogaster*. Individual stages are prolonged to the same proportion. Their recognition was based on stage-specific mutational properties which coincided well with those reported from *D. melanogaster*.

A method is presented which permits the scoring of sex-linked recessive lethals in *D. hydei*. The method was used to determine the frequency of X-ray induced lethal mutations. This turned out to be $2.3 \times 10^{-2}/1000\text{R}$ in submature sperm and advanced spermatids, on the average. Measurements were made over a wide dose-range, between 1.5 und 12 kR. No noticeable difference was observed between *D. melanogaster* and *D. hydei* with respect to the rate of induced lethals. The mutation rates in *D. funebris* and *D. subobscura* seem to agree with this same figure.

D. hydei differs from *D. melanogaster* in the architecture of the X chromosome. Presumably because of this difference, two particular mutational events registered most clearly in the experiments with *D. hydei*: (1) In the first generation progeny of irradiated males, a dose-dependent shift of the sex ratio was observed. This is due most likely to sex-linked types of mutation with dominant lethal effect, induced during spermiogenesis. The estimated rate of the dominant lethal effect is about twice that of recessive lethals. (2) Early stages of spermatogenesis were found to be particularly susceptible to the induction of *bobbed* deletions. This mutational event is interpreted as a breakage phenomenon whereby the nucleolar organizer region gets separated from the X chromosome and is subsequently lost.

Einleitung

Über 100 zur Verfügung stehende Mutationen von *Drosophila hydei* sind von Spencer (1949) in eine Untersuchung einbezogen worden, welche die Festlegung der Koppelungsgruppen und die Erstellung einer genetischen Karte des X-Chromosoms für diese Art ermöglichte. Eine Homologisierung der Chromosomen-Elemente von *Drosophila melanogaster* und *D. hydei* durch Vergleich der Bandmuster in den Speicheldrüsenchromosomen ist für die zwei, verschiedenen Untergattungen angehörenden Arten nicht generell durchführbar (van Breugel et al., 1968), hingegen konnte Spencer diese Zuordnung anhand homologer Mutationen vornehmen. Von den 23 untersuchten geschlechtsgekoppelten Faktoren von *D. hydei* sind 12 «gute» Homologe. Diese finden sich auch bei *D. melanogaster* auf dem X-Chromosom, und bis heute ist keine Parallelmutation bekannt, welche Partien des X-Chromosoms der einen Art als homolog mit autosomalen Genomanteilen der andern identifizieren würde. Man darf annehmen, dass weitgehend derselbe Genbestand in den entsprechenden Chromosomen beziehungsweise Chromosomenarmen beider Arten untergebracht ist, insbesondere in den euchromatischen Armen der Geschlechtschromosomen. Andererseits fällt aber auf, dass die Rekombinationskarten des X-Chromosoms (Spencer, 1949) und wahrscheinlich auch der Autosomen (H.R. Kobel, unveröffentlicht) von *D. hydei* länger sind als die von *D. melanogaster*. Die Rekombinationsereignisse auf dem X-Chromosom müssen bei *D. hydei* beinahe doppelt so häufig sein¹, und es fragt sich, ob dem einen Unterschied auf dem Niveau der genetischen Organisation in unserer Kenntnis noch weitere hinzuzufügen sind und ob gegebenenfalls ein Zusammenhang besteht zwischen den Phänomenen.

Vorweg interessant und auch bei *D. hydei* durchführbar erschien die Ermittlung der Mutationsrate für rezessive, geschlechtsgekoppelte Letalfaktoren durch Bestrahlungsexperimente. Bestimmungen des Wertes dieses experimentellen Mutabilitätsparameters bei *D. melanogaster*, die zum Vergleich herangezogen werden sollen, veröffentlichten Timoféeff-Ressovsky (1939), Traut (1963) und Lefevre et al. (1964b). Bei ihren Untersuchungen konnten diese Verfasser auf die von Muller entwickelten Methoden zum Nachweis solcher Schadenfaktoren zurückgreifen (Muller, 1928a, b; Spencer et al., 1948). Hier soll für *D. hydei* ein Testverfahren beschrieben werden, welches – analog zur CIB-Technik Mullers – die Möglichkeit erschliesst, X-Chromosomen, die Letalfaktorenträger sind, zuverlässig als solche zu bestimmen.

¹ Beispiele zum Vergleich: Die acrocentrischen X-Chromosomen von *D. virilis* und *D. mul-leri* sind – in Crossing-over-Einheiten gemessen – beide fast 2,5mal so lang wie das X-Chromosom von *D. melanogaster* (Chino, 1936; Spencer, 1957).

Bei der Erzeugung von Mutationen durch ionisierende Strahlen in den Keimzellen adulter *Drosophila*-Männchen ist von Belang, dass Spermatogonien wesentlich weniger empfindlich sind als die späteren Stadien der Spermatogenese (Zusammenfassung bei Catcheside, 1948), wobei die postgonialen Zellen auch ihrerseits wieder durch unterschiedliche, stadienspezifische Mutationsraten charakterisiert sind. Bestrahlt man zum Beispiel junge Männchen, so werden in den reifen Testes neben Spermien auch Spermatiden, Spermatocyten und Spermatogonien getroffen. Während einer ersten Periode geben die Männchen zunächst bestrahlte Spermien ab, in einer anschliessenden Phase werden als Spermatiden bestrahlte Keimzellen frei, in der dritten Phase sind es die bestrahlten Spermatocyten und in der letzten die bestrahlten Spermatogonien, die zu reifen Spermien werden. Wenn die Länge dieser Zeitabschnitte nicht bekannt ist, wird man sich behelfen, indem man die Männchen in regelmässigen Abständen neue virginelle Weibchen begatten lässt und die Nachkommen-schaft jeder dieser Bruten analysiert. Unterschiedliche Sensibilität der Keimzellstadien führt dann zu brutspezifischen Häufigkeiten des untersuchten Mutationsereignisses und im zeitlichen Experimentablauf zu einem Brutmuster. Dies belegen beispielsweise die Untersuchungen an *D. melanogaster* von Auerbach (1954) und Traut (1963) für rezessive Letalfaktoren, von Lünig (1952) und Bateman (1956) für dominante Letalfaktoren sowie von Moriwaki et al. (1967) und Hannah-Alava (1968) für geschlechtsgekoppelte Mutationsformen, die sich in der Filialgeneration durch Veränderungen im Geschlechtsverhältnis manifestieren. Die Brutmuster-Methode ist in den vorliegenden Untersuchungen durchgehend angewandt worden.

Als Kriterien bei der Charakterisierung des Brutmusters sollen dienen: (1) die Sterilitätsphase als Ausdruck dominanter Letalität, (2) durch Bestrahlung verursachte Verschiebungen des Geschlechtsverhältnisses und (3) die Änderung der Häufigkeit induzierter rezessiver Letalfaktoren im Experimentablauf. Vom Vergleich mit den Ergebnissen bei *D. melanogaster* werden Auskünfte über den zeitlichen Ablauf der Spermatogenese bei *D. hydei* erwartet. In der Gegenüberstellung der Arten können mit dieser Kenntnis jene Mutationsraten verglichen werden, die auf Mutationserzeugung in homologen Stadien der Keimzellenentwicklung beruhen.

Material und Methoden

Nachweis induzierter Letalfaktoren des X-Chromosoms: Beschreibungen der in den Kreuzungen benutzten Markierungsgene, von denen die meisten bereits Spencer (1949) zur Verfügung standen, wurden von Kobel und Gloor (1971) zusammengestellt. Das Schema in Fig. 1 veranschaulicht die Testmethode: Bestrahlte Männchen des Wildstamms *Madeira* wurden mit Weibchen gekreuzt, die heterozygot für die lange Inversion *forked-3* (Symbol: *In (1)f³*) waren. Das invertierte X ist dominant markiert mit *Abruptex* (*Ax*), trägt zudem die rezessiven Faktoren *yellow* (*y*) und *miniature* (*m*) sowie ausserhalb der Inversion die Marker *cherry* (*ch*)

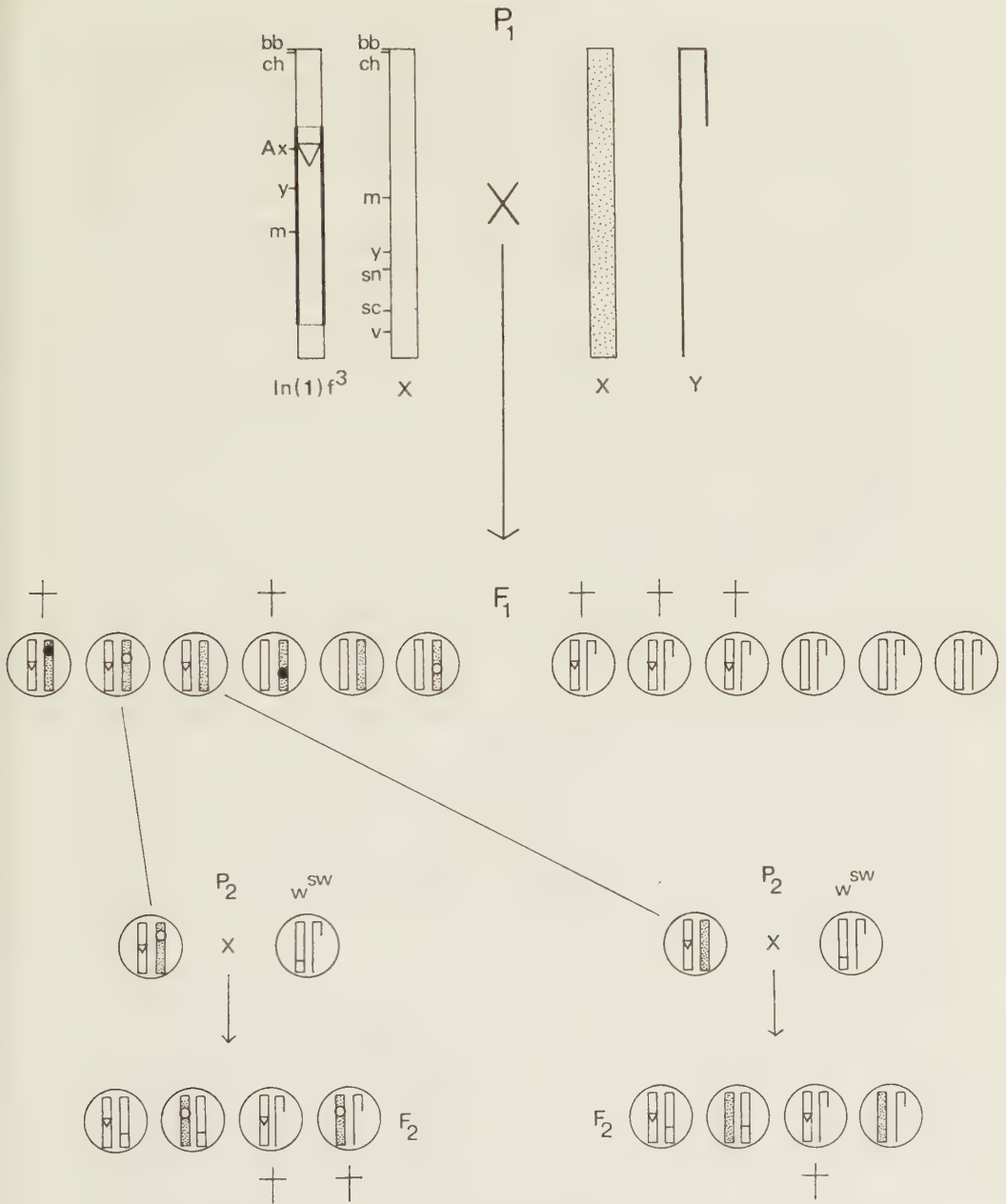


Fig. 1 Nachweis rezessiver Letalfaktoren im Zwei-Generationen-Test bei *D. hydei*. P₁: Be-strahlte Männchen mit einem mutationsfreien X-Chromosom werden bestrahlt und mit in-versionsheterozygoten Weibchen gekreuzt. In der F₁ manifestieren sich neuerzeugte domi-nante Letalfaktoren des X-Chromosoms (●) bei den Weibchen; die Hälfte der Männchen ist letal, weil *Ax* (▽) an sie weitervererbt wird. F₁-Weibchen werden einzeln weitergekreuzt (P₂). In der F₂ erscheinen keine Wildtyp-Männchen, wenn das bestrahlte X einen rezessiven Letal-faktor (○) enthält (links), wohl aber wenn das X-Chromosom heil geblieben ist (rechts).

und *bobbed* (*bb*) in Centromernähe. Das zweite X der Weibchen ist inversionsfrei und mehrfach markiert mit *v* (*vermilion*), *sc* (*scute*), *sn* (*singed*), *y*, *m*, *ch* und *bb*. Die Kreuzung ♀♀ *In(1)f³*, (*Ax y m*)*f³ ch bb/v sc sn y m ch bb* × ♂♂ *wild, bestrahlt* bringt Söhne hervor, die das nicht-invertierte mütterliche X tragen; mit gleicher Frequenz entstehen auch männliche Zygoten, die das dominant markierte X-Chromosom enthalten, jedoch nicht lebensfähig sind, da *Ax* hemizygot letal wirkt. Die weiblichen Zygoten erhalten zu gleichen Teilen den einen oder anderen Typ der mütterlichen X-Chromosomen und sind vital, sofern nicht in den väterlichen Keimzellen durch Bestrahlung dominante Letalfaktoren induziert wurden. Da die väterlichen X-Chromosomen auf die Töchter übergehen, ergibt sich bei diesen dosisabhängig ein Ausfall, bedingt durch die dominanten Letalfaktoren auf dem bestrahlten X (Muller, 1928b). Die X-Chromosomen der Söhne hingegen sind mütterlichen Ursprungs und tragen zur strahlungsbedingten Sterblichkeit nichts bei. Somit erhält man mit dem Geschlechtsverhältnis in der F₁ ein Häufigkeitsmass für die Induktion dominanter, X-chromosomal Letalfaktoren. Die vitalen Töchter können im weiteren auf dem bestrahlten X einen rezessiven Letalfaktor tragen. Weibchen mit dem dominant markierten mütterlichen und dem bestrahlten väterlichen X wurden durch eine Auskreuzung einzeln geprüft. Dazu werden Männchen mit einem markierten X-Chromosom benötigt; in diesem Falle wurde die Mutation *white-sneeuw* (*w^{sw}*) verwendet. In der Nachkommenschaft des Testweibchens finden wir Söhne vom Wildtyp, falls das bestrahlte X letalfaktorenfrei ist. Wenn aber auf dem bestrahlten Chromosom ein rezessiver Letalfaktor vorhanden ist, wird das Weibchen ohne Söhne bleiben. Die Inversion *forked-3* verhindert, dass durch Crossing-over zwischen dem männchen-letalen *Ax* und dem neu erzeugten Letalfaktor ein vitales X rekombiniert wird. Sollten vitale X-Chromosomen durch Austausch doch noch zustande kommen – etwa durch Doppel-Crossing-over innerhalb der Inversionsstrecke oder durch einfaches Crossing-over zwischen Inversion und Centromer – sind sie sofort erkennbar, weil die seltenen Söhne dann die Phäne der Markiergene *y*, *m* oder *ch* zeigen. Vereinzelt weissäugige Männchen weisen die patrokline Vererbung unbestrahlter Chromosomen nach, wie dies bei mütterlichem Nichttrennen der X-Chromosomen vorkommen kann.

Experimente: I. Das Hauptexperiment bestand aus 10 Versuchsserien. Als Kontrolle diene Serie 1, die übrigen waren Bestrahlungsversuche: Serie 2 (1500 R), Serien 3–5 (3000 R), Serien 6–8 (6000 R), Serien 9 und 10 (12 000 R). Wildtyp-Männchen, die innerhalb von 24 Stunden geschlüpft waren, wurden während 5 Tagen gealtert und anschliessend bei Raumtemperatur in Luft bestrahlt. Hierzu diente eine Röntgen-Röhre Utilis 8514 der Firma Enraf-Nonius, Delft (Niederlande), welche bei Focus-Abständen von 7,0 cm oder 9,8 cm Dosisraten von 360 oder 180 R/min abgab. Durch Variation der Expositionszeit wurden Dosen bis zu 6000 R bei 9,8 cm Focus-Abstand appliziert (Serien 2–5, 7, 8); die Bestrahlung mit 6000 oder 12 000 R in den Serien 6, 9 und 10 erfolgte mit 7 cm Focus-Distanz. Sofort nach Bestrahlung wurden die Männchen einzeln und narkosefrei mit je vier virginellen Weibchen *In(1)f³*, (*Ax y m*)*f³ ch bb/v sc sn y m ch bb* gekreuzt. Nach jeweils drei Tagen waren die Weibchen zu ersetzen, um getrennte Bruten (A bis H) zu erhalten. Das Alter der Weibchen war standardisiert 9–12 Tage. Zur Regulation der Populationsdichte der Nachkommenschaften wurde das Futter während der Bruten A bis D sowie G und H täglich gewechselt, wenn die verwendete Strahlendosis 3000 R nicht überschritt. Bei Serien mit 6000 R erfolgte innerhalb der dreitägigen Brutperioden je eine oder zwei zusätzliche Umsetzungen; bei 12 000 R war optimale Dichte zu erreichen, wenn die Elterntiere drei Tage auf demselben Futter belassen wurden. Aus der analysierten F₁ wurden Weibchen vom Genotyp *In(1)f³*, (*Ax y m*)*f³ ch bb/X* (*bestrahlt*) isoliert, während 7 bis 14 Tagen gealtert und einzeln mit einem oder zwei Männchen *w^{sw}/Y* gekreuzt. Von jeder Testzucht konnten durch Futterwechsel in der Regel drei Repliken erhalten werden. Nachkommenschaften einzelner Weibchen, die weniger als 8 Tiere umfassten, wurden nicht ausgewertet. Wenn ein Weibchen wegen des Fehlens von Wildtyp-Söhnen als Trägerin eines induzierten rezessiven Letalfaktors auf dem bestrahlten X klassifiziert wurde, stützte sich die Beurteilung, wo immer möglich, auf zwei Repliken. Kriterium für Nichtletalität des bestrahlten X war das Auftreten von Wildtyp-Männchen, auch

wenn diese bisweilen nur in geringer Anzahl vorkamen; subvitale und semiletale X-Chromosomen (Hadorn, 1955) wurden also der vitalen Klasse zugeordnet. Traten in der Nachkommenschaft keine Wildtyp-Männchen, wohl aber vereinzelte *ch*-Männchen auf, wurde das Chromosom als letal verzeichnet, da ein erzeugter Letalfaktor auf der Chromosomenstrecke zwischen dem *forked*- und dem *cherry*-Locus eine solche Zusammensetzung der Nachkommenschaft impliziert. Die Frequenz letaler Chromosomen wurde je Serie für die ersten drei Bruten A, B und C bestimmt, in den Serien 3 und 6 führte die Auswertung weiter bis zu Brut H (22.–24. Tag nach Bestrahlung).

Alle F_1 - und F_2 -Kulturen erfolgten in Glasröhrchen mit den Abmessungen $2,5 \times 8$ cm. Sie enthielten etwa 10 ml Futter der folgenden Zusammensetzung: Mais (10 g), Zucker (5 g), Trockenhefe (3 g), Agar (1 g) und Wasser (100 ml) mit 0,8% Propionsäure. Als Standard-Temperatur wurde $25 \pm 1^\circ\text{C}$ gewählt.

Einige Zusatzexperimente (II–V) hatten vorwiegend methodologische Zielsetzung.

II. Ein Versuch mit Männchen aus dem Wildstamm *Madeira* und Weibchen vom Genotyp $In(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb/v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb$ sollte Aufschluss geben über die Spermienabgabe bei den Männchen und den Spermienverbrauch bei den begatteten Weibchen, da bei Brutmuster-Untersuchungen Kenntnisse hierüber vonnöten sind (Mossige, 1955). Die 20 zu prüfenden Männchen, bei Versuchsbeginn etwa 4 Tage alt, wurden während 9 Tagen täglich mit 5 kopulationsbereiten, virginellen Weibchen zusammengebracht. Nach 24 Stunden kamen die Weibchen einzeln und ohne Männchen in Zuchtröhrchen, wobei 2 und 4 Tage später das Futter gewechselt wurde. Die Anzahl erfolgreicher Begattungen jedes Männchens pro Tag konnte anhand der Anzahl Weibchen mit Nachkommen bestimmt werden. Die Bezeichnung «Kontrolle II» nimmt im folgenden jeweils Bezug auf die Auszählung der F_1 in diesem Versuch.

III. Die Rekombination innerhalb und ausserhalb der Inversion *forked-3* bei strukturheterozygoten und strukturhomozygoten Weibchen wurde geprüft anhand der Segregation aus den Kreuzungen $\text{♀ } In(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb/v\ sc\ sn \times \text{♂ } \delta\delta\ v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb/Y$ und $\text{♀ } In(1)f^3/In(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb \times \text{♂ } \delta\delta\ v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb/Y$.

IV. Dem gleichen methodischen Schema wie die Versuche im Hauptexperiment I folgten die Bestrahlungsserien 11, 12 und 13 mit einer Dosis von 12 000 R. Sie führten bis Brut G, also bis zum 21. Tag nach Bestrahlung. Es wurde jedoch nur die Zusammensetzung der Nachkommenschaften in der F_1 , im Zusammenhang mit dem Brutmuster, betrachtet.

V. Da die Bestrahlung von Drosophila-Männchen mit hohen Dosen Sterilität auslösen kann (Bateman, 1956), wurden 14 Männchen mit 15 000 R und 20 Männchen mit 18 000 R bestrahlt (360 R/min) und in Massenzucht mit jeweils 20 virginellen Weibchen aus demselben Wildstamm *Madeira* auf Fertilität geprüft. Umsetzungen erfolgten alle 3 Tage bis zu Brut D (10.–12. Tag nach Bestrahlung), jedoch ohne Erneuerung der Weibchen.

Ergebnisse

1. Die Inversion *forked-3*

Tab. 1 fusst auf Versuchen mit unbestrahlten Tieren und informiert über die meiotische Segregation von mütterlichen X-Chromosomen bei heterozygotem oder homozygotem $In(1)f^3$ -Karyotyp. In Experiment II umfasste die Nachkommenschaft inversionsheterozygoter Weibchen (a) neben den erwarteten regulären Phänotypklassen auch Ausnahmen, nämlich Weibchen mit dem mütterlichen, mehrfach mutanten Phänotyp und Männchen mit dem väterlichen Wildtyp-X. Es kommt also mütterliches Nichttrennen der X-Chromosomen vor. Einziger phänotypischer Unterschied zwischen den Müttern (XX) und den Ausnahmetöchtern (XXY) war die Unterdrückung der Manifestation des X-

Tab. 1 Durch die *forked-3*-Inversion verursachtes Nichttrennen der X-Chromosomen in der mütterlichen Meiose bei Strukturheterozygotie (a, b, c), fehlendes Nondisjunction bei Inversionshomozygotie (d). *Ax* wirkt hemizygot letal und führt in der F_1 zu einem Geschlechtsverhältnis von 2:1 bei den regulären Nachkommen.

Kreuzung	F ₁ : regulär		Nondisjunction		Häufigkeit des Nichttrennens
	♀♀ (XX)	♂♂ (XY)	♀♀ (XXY)	♂♂ (XO)	
<i>Experiment II</i>					
(a) $\frac{\text{In}(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb}$ ♂♂ +/Y	3421	1624	81	109	5,4% ¹
<i>Stamm</i>					
(b) $\frac{\text{In}(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb}$ ♂♂ v sc sn y m ch bb/Y	8215 ²	—	479	—	5,5% ²
<i>Experiment III</i>					
(c) $\frac{\text{In}(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{v\ sc\ sn}$ ♂♂ v sc sn y m ch bb/Y	5143	2539	274	166	7,9% ¹
(d) $\frac{\text{In}(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{\text{In}(1)f^3}$ ♂♂ v sc sn y m ch bb/Y	839	307	0	0	0%

¹ $[\Sigma(XXY) + \Sigma(XO)] / [1/2\Sigma(XX) + \Sigma(XY) + \Sigma(XXY) + \Sigma(XO)]$

² Für die Schätzung der Nondisjunction-Frequenz bei (b) wurde nur die eine, inversionsheterozygote, Phänotyp-Klasse der beiden regulären XX-Klassen herbeigezogen:
 $\Sigma(XXY) / [\Sigma(XX) + \Sigma(XXY)]$

chromosomal homozygoten *bobbed*-Genotyps durch den *bb*⁺-Locus auf dem zusätzlichen Y väterlichen Ursprungs. Im Stamm, in dem die Inversion fortlaufend heterozygot gezüchtet wurde, waren sämtliche X-Chromosomen mit *bb* markiert. Beim Ansatz neuer Kulturen wurden jeweils Weibchen mit dem *bb*-Phänotyp ausgesucht (b), welche also kein Y-Chromosom besaßen. Trotz-

Tab. 2 Experiment III: Rekombination bei Strukturhomozygotie (a) und Strukturheterozygotie (b) für $In(1)f^3$. Segregation in der F_1 nach Kreuzung der beiden Müttertypen mit $v\ sc\ sn\ y\ m\ ch\ bb/Y$ -Männchen. Da Ax hemizygot letal wirkt und $In(1)f^3$ die Überlebenschance der männlichen Träger um über 25% vermindert, wurde nur die Segregation bei den Weibchen berücksichtigt.

Mütterlicher Genotyp	Rekombinationstyp	Gen-Sequenz			Total
(a) $\frac{In(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{In(1)f^3}$		m---y---Ax---ch			
	austauschfrei				335
	Einzelaustausch	88	92	243	423
	Doppelaustausch	2	2		2
		49		49	49
			30	30	30
	Total	139	124	322	839
	Austauschfrequenz	17%	15%	38%	
(b) $\frac{In(1)f^3, (Ax\ y\ m)f^3\ ch\ bb}{v\ sc\ sn}$		v---[In(1)f ³]---ch			
	austauschfrei				4773
	Einzelaustausch	0		370	370
	Total				5143
	Austauschfrequenz	0%		7%	

dem traten in jeder Generation wieder Nondisjunction-Töchter auf, die am bb^- -Phänotyp erkennbar waren. Y-freie Weibchen aus diesem Stamm wurden einerseits mit Männchen gekreuzt, die ein *forked-3*-Chromosom besaßen. Andererseits erfolgte auch eine Kreuzung mit Männchen, deren X-Chromosom von normaler Struktur war. In der nächsten Generation wurden aus diesen Kreuzungen die inversionsheterozygoten (c) und die inversionshomozygoten Weibchen (d) für den Ansatz von Experiment III ausgelesen. Nichttrennen der Geschlechtschromosomen wurde nur bei den inversionsheterozygoten Weibchen festgestellt. Zusammengekommen belegen diese Ergebnisse, dass das Nichttrennen aufgrund der Inversionsheterozygotie erfolgt und von primärer Art ist. Die anhand der Phänotyp-Segregation errechneten Nondisjunction-Frequenzen können nur als angenäherte Bestimmungen gelten, da die zahlreichen Markiergene unterschiedlich vitalitätsbeeinflussend wirken. Der wahre Wert dürfte immerhin zwischen 5 und 10% liegen. In den vorläufigen Angaben über die *forked-3*-Inversion (Hess et al., 1965) wird das relativ häufige Nichttrennen nicht erwähnt, weshalb abzuklären blieb, ob die Strukturmutation noch der ursprüng-

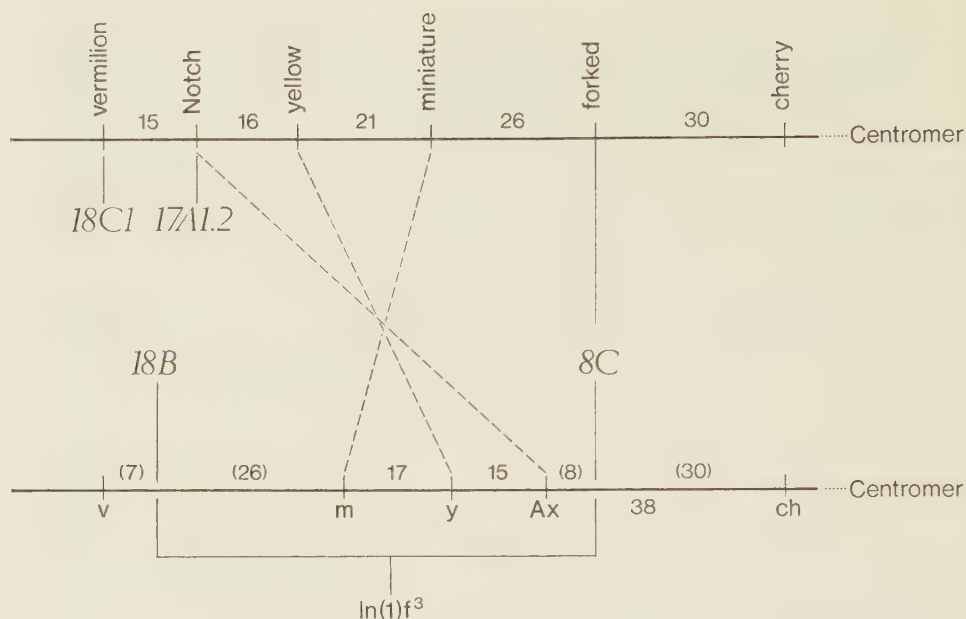


Fig. 2 Vergleichende Darstellung der genetischen Karten von Standard-X (oben) und Inversions-X $In(1)f^3$. Die Lokalisation des *forked*-Locus in der Standardanordnung stammt von H.R. Kobel (unveröffentlicht), alle andern Positionen sind von Spencer (1949) übernommen. Die Kartenabstände für das invertierte X beruhen auf den Angaben in Tab. 2; durch Interpretation ermittelte Abstände stehen in Klammern. Kursiv sind die cytologischen Lokalisationen angegeben (Quellen im Text).

lichen Beschreibung entspricht. Dr. F. van Breugel (Leiden) überprüfte freundlicherweise die Inversion und ihre Bruchstellen in den Speicheldrüsenchromosomen unseres Stamm-Materials und bestätigte die frühere Charakterisierung (van Breugel et al., 1968, Kobel und Gloor, 1971). Das Vorkommen von mütterlichem Nondisjunction machte die Verwendung von Männchen mit einer X-chromosomal Markierung beim Ansatz der Einzelweibchen-Tests im Hauptversuch erforderlich. Um die Fertilität und Vitalität dieser Männchen möglichst hoch zu halten, wurde jedoch auf eine mehrfache Markierung verzichtet und lediglich ein *white*-Allel (w^{sw}) benutzt.

Ein Urteil über die Brauchbarkeit der *forked-3*-Inversion als Crossing-over-Unterdrücker wird aufgrund der beobachteten Rekombinationsfrequenzen ermöglicht. Im 4-Faktoren-Versuch (Tab. 2, a) mit inversionshomozygoten Weibchen wurden die Distanzen zwischen den Faktoren Ax (wahrscheinlich eine Mutation am *Notch*-Locus), y, m und ch geschätzt. Aus dem Vergleich mit der Standard-Karte (Fig. 2) geht hervor, dass die Loci Ax, y und m innerhalb der Inversion liegen. Die Distanz von Ax zum proximalen Inversionsbruch ist auf

minimal $8 \pm$ Einheiten zu veranschlagen; der Abstand von v zum distalen Bruch misst demnach maximal $7 \pm$ Einheiten. Anhand der Rekombinationsdaten wurde die Karte des Inversions-Chromosoms vom *ch*-Ende her rekonstruiert. Dabei kam der distale Inversionsbruch zwischen *Notch* und v zu liegen – eine Position, die übereinstimmt mit der Lokalisation in Speicheldrüsenchromosomen (van Breugel, 1971; van Breugel et al., 1968; Kobel und Gloor, 1971). Die Längen der Rekombinationskarten von Standard-X und $In(1)f^3$ weichen nur unbedeutend voneinander ab. Bei heterozygotem Karyotyp ist der Austausch im Abschnitt zwischen v und f unterdrückt. Die Häufigkeit des Doppelaustausches innerhalb der Inversionsstrecke liegt bei einem Promille. Im proximalen Chromosomenabschnitt, zwischen $In(1)f^3$ und *ch*, ist der Austausch von $30 \pm$ auf $7 \pm$ Einheiten herabgesetzt (Tab. 2, b). Im Hauptversuch wurde ein mehrfach markiertes Inversions-Chromosom [$In(1)f^3$, (*Ax y m*) f^3 *ch bb*] verwendet, um mögliche Austauschereignisse zu erkennen. Damit sollte jeder neuinduzierte rezessive Letalfaktor eindeutig nachweisbar sein, sofern er im Intervall v -*ch* ($107 \pm$ Rekombinationseinheiten) auftritt. Cytologisch entspricht dieser Abschnitt ungefähr den proximalen $7/8$ des X-Chromosoms (Karte von Berendes, 1963). Die beträchtliche Austauschunterdrückung durch Inversionsheterozygotie macht es wahrscheinlich, dass Letalfaktoren auch dann erkannt wurden, wenn sie im distalen Achtel des Chromosoms auftraten.

2. Brutmuster

Biologische Faktoren: Sollen aus dem kontinuierlich erneuerten Spermienangebot bestrahlter Männchen die reifen Keimzellen nach ihrem Alter fraktioniert auf die erlittene genetische Schädigung untersucht werden, hängt das Auflösungsvermögen der Methode weitgehend vom artspezifischen Fortpflanzungsverhalten ab. Frischgeschlüpfte Männchen von *D. hydei* benötigen nach allgemeiner Erfahrung 5 bis 6 Tage, bis sie geschlechtsreif werden (Tab. 3). Die Latenzzeit entspricht wahrscheinlich einer finalen Reifungsperiode in der Spermatogenese. Wenn in den Versuchsreihen die F_1 -Kulturen erst ab dem zweiten Tag nach Bestrahlung angingen (z.B. Fig. 3, 3000 R), ist dies kaum als Folge der Strahlenbehandlung zu interpretieren, vielmehr zeigt der Befund den juvenilen Zustand der verwendeten Männchen an. Die Wahl möglichst junger fortpflanzungsfähiger Männchen sollte verhindern, dass Lager gealterter und strahlenempfindlicher Spermien angereichert werden und in die analysierten Stichproben Eingang finden, was bei *D. melanogaster* zu widersprüchlichen Resultaten geführt hat (Diskussion bei Lefevre et al., 1964b).

Mit Erreichen der Fortpflanzungsreife sollten die bestrahlten Männchen von Brut zu Brut die neugebildeten Spermien möglichst restlos abgeben, wenn im

Tab. 3 Experiment II: Fertilität von 20 unbestrahlten *Madeira*-Männchen, täglich mit je 5 virginellen Weibchen *v sc sn y m ch bb/ln(1)f³, (Ax y m)f³ ch bb* zusammengebracht. Die nach einem Tag isolierten Weibchen zeigten erfolgreiche Insemination durch das Ablegen befruchteter Eier vorwiegend in der ersten der beiden anschließenden Zuchtperioden von je 2 Tagen an. Ein Männchen war steril.

Alter der Männchen (Tage)	Anzahl befruchteter Weibchen pro Männchen						Anzahl fertiler Zuchten nach Isolation der Weibchen	
	0	1	2	3	4	5	1.-2. Tag	3.-4. Tag
4±1	19	0	0	0	0	0	0	0
5±1	19	0	0	0	0	0	0	0
6±1	11	1	2	1	0	4	28	2
7±1	4	0	0	6	6	3	57	3
8±1	2	2	0	0	6	9	71	1
9±1	2	0	0	8	4	5	65	0
10±1	1	1	0	3	8	6	72	2
11±1	0	0	2	0	6	11	83	15
12±1	0	1	1	8	5	4	67	0

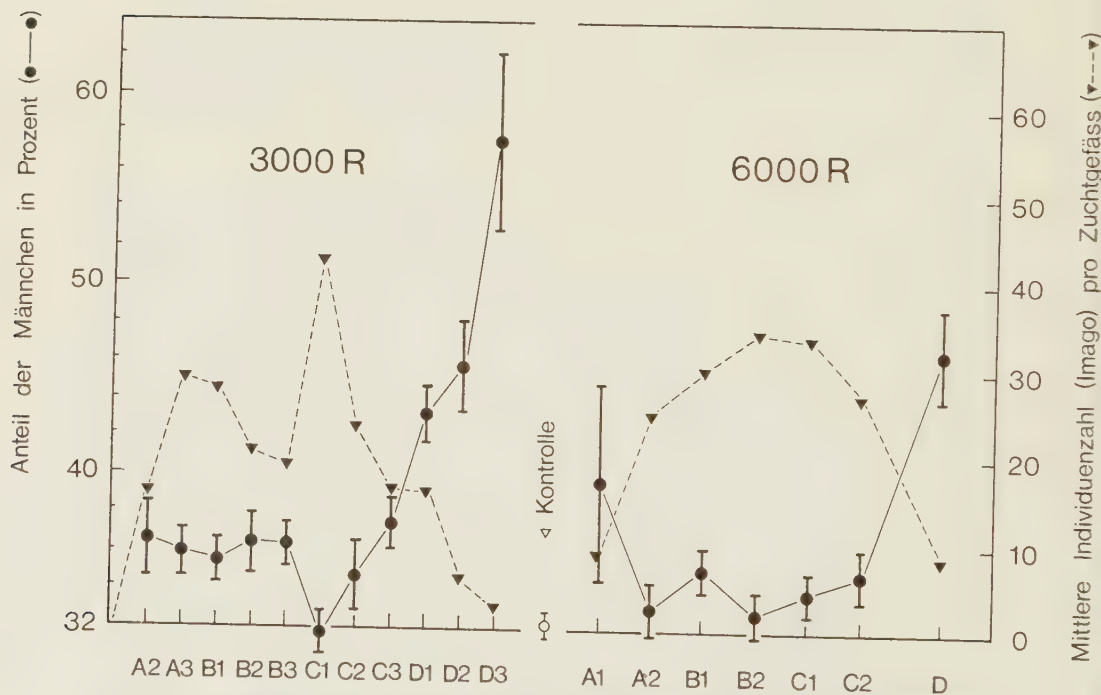


Fig. 3 Prozentualer Männchenanteil (●—●) in der Nachkommenschaft bestrahlter Väter und mittlere Populationsdichte (▼—▼) pro Zuchtgefäß, für zwei Strahlungsdosen und für die prästerilen Bruten A bis D, je ein- oder zweimal unterteilt. Der Kontrollwert betrug 32,2% ♂♂. Bestrahlung vermindert den Weibchenanteil, während hohe Populationsdichte gegen die mehrfach mutanten Männchen selektiv wirkt.

Brustmusterverlauf das scharfgeschnittene Ebenbild der zum Zeitpunkt der Bestrahlung getroffenen Serie von Spermatogenesestadien gesucht wird. Kontrollexperiment II (Tab. 3) ergab, dass unbestrahlte Männchen täglich ohne weiteres 4 oder 5 virginelle Weibchen erfolgreich begatten. Der Spermienvorrat wird jedoch von den Weibchen relativ rasch aufgebraucht, erbringen sie doch, isoliert gehalten, nach Ablauf von zwei Tagen kaum noch Nachkommen. Beobachtungen über das Paarungsverhalten von *D. hydei* (Wildstamm *Madeira*) lassen des weiteren annehmen, dass Männchen in Balzstimmung die Spermien gleichentags in mehrmaligen Kopulationen an dieselben Weibchen freigeben können². Die in den Bestrahlungsserien durchgehend verwendete Versuchsanordnung, bei der den Einzelmännchen in Abständen von drei Tagen je vier virginelle Weibchen beigegeben wurden, ist lediglich eine Optimierung, mit der eine möglichst vollständige Spermienabgabe durch die Männchen angestrebt wurde, die es jedoch erlaubte, die Anzahl bereitzustellender Weibchen in ökonomischen Grenzen zu halten. Die anschliessend dargelegten Resultate werden zeigen können, dass der gewählte Modus die Spermienmuster verschiedener Altersstufen zufriedenstellend genau voneinander zu trennen vermochte.

Sterilität: Bei allen Brutmuster-Experimenten, die über Brut C hinaus fortgeführt wurden, liess sich eine ausgeprägte Phase temporärer Sterilität der strahlenbehandelten Männchen feststellen. In den Serien 11–13 (12000 R) umfasste sie die Bruten E, F und G. Während in den prästerilen Bruten A, B und C im Mittel je etwa 14 F₁-Nachkommen pro Männchen erhalten wurden, fiel der Durchschnitt in Brut D auf ungefähr 1; anschliessend erwiesen sich die rund 90 Männchen über 9 Tage hinweg als absolut steril. Dieser Zustand blieb jedoch nicht definitiv, konnten doch am Übergang zwischen den Bruten G und H, 21 Tage nach Bestrahlung, wieder Nachkommen erhalten werden. Dieses Fertilitätsmuster fand sich auch bei den nächstniedrigeren angewandten Bestrahlungsdosen (Tab. 4). Bei 6000 R (Serie 6) waren annähernd alle Männchen bis zu Brut D fertil, in Brut E noch 2 von 99 und in F eines von 96. Die Fertilität kam in Brut G wieder auf den Normalstand (84/87). In Serie 3 (3000 R) können die Zeitgrenzen der sterilen Phase genauer abgelesen werden, weil hier die Einzelmännchen-Zuchten mit täglichem Futterwechsel geführt

² Nach der ersten erfolgreichen Kopulation (ca. 120 sec) weist das Weibchen den balzenden Partner während mindestens 3 Minuten ab. Nach einer Stunde wird ein neues Männchen oft wieder zugelassen, jedoch erfolgt die Kontaktnahme mit Verspätung, und die Kopulationszeit (ca. 60 sec) ist wesentlich verkürzt. Ein drittes balzendes Männchen kann eine weitere Stunde später vom Weibchen wiederum akzeptiert werden, wenn auch erst nach langdauernder Kontaktnahme. Die Kopulation (ca. 160 sec) dauert nun länger als eine Erstkopulation. Fast stets zeigen die Weibchen nach einer Kopulation Abwehrreaktionen gegenüber balzenden Männchen. Ist diese Stimmung abgeklungen, dürfte der Füllungsgrad der Receptacula über die Bereitschaft zu weiteren Paarungen entscheiden. Literatur zum Vergleich: Maynard Smith (1956).

Tab. 4 Fertilität bestrahlter Männchen im Brutmuster-Experiment, ausgedrückt durch den prozentualen Anteil fertiler Männchen ohne Berücksichtigung des Umfangs der individuellen F_1 -Populationen. NB und NE: Anzahl Männchen zu Beginn und Ende der Versuche. A–H: Aufeinanderfolgende Brutperioden von je 3 Tagen. 3000 R: Resultate der Serie 3; drei sukzessive Repliken durch täglichen Futterwechsel ausser in den Bruten E und F. 6000 R: Resultate der Serie 6; je ein zusätzlicher Futterwechsel während der Bruten A–C.

Dosis	Replika	NB	A	B	C	D	E	F	G	H	NE
3000 R	1.	99	2%	87%	*	93%	20%	5%	3%	96%	71
	2.		45%	94%	99%	95%			46%	100%	
	3.		97%	95%	100%	71%			97%	100%	
6000 R	1.	100	11%	100%	100%	94%	2%	1%	97%	100%	87
	2.		95%	100%	97%						

*) Fehlende Beobachtung.

wurden: Sie dauert minimal etwa 8 Tage, vom 12. zum 20. Tag nach Bestrahlung; vermutlich wird gegen Ende der Phase, um den 17. Tag, ein Sterilitätsmaximum erreicht. Bei *D. hydei* tritt demnach eine differentielle Strahlenempfindlichkeit der Spermatogenesestadien deutlich zutage, wobei diese aufgrund des Fertilitätsmusters in drei Hauptkategorien zu scheiden sind.

Geschlechtsverhältnis: Es ist von Interesse, festzustellen, ob im Übergang zwischen der prästerilen und der sterilen Phase Spermien freigegeben werden, die eine eigene, von den benachbarten Klassen verschiedene Charakteristik zeigen, oder ob hier einfach eine Zwischenperiode vorliegt, während der zwei Hauptklassen gemischt vorkommen. Wie aus dem Fertilitätsverlauf in den Bestrahlungsexperimenten geschlossen werden kann, entspricht Brut D der prästerilen Übergangsphase. Falls sich die fertile und die sterile Periode hier «überlappen», müssen die adulten F_1 -Nachkommen aus dieser Brut eine Strahlenschädigung zeigen, die mit den vorangegangenen fertilen Bruten A–C übereinstimmt. Aus dem Brutmuster des Geschlechtsverhältnisses in Serie 3 (Fig. 3, 3000 R) geht zunächst hervor, dass schon in den ersten drei Bruten eine Verschiebung zugunsten der männlichen Nachkommen eintrat, deren Anteil im Kontrollexperiment II $32,2 \pm 0,7\%$ ausmachte. Im Verlauf der Brut D hob sich aber das Verhältnis, Tag für Tag weiter zunehmend, stärker vom Kontrollwert ab und lag auch statistisch gesichert über dem Mittel der vorangegangenen Experimentalbruten. Einzig am ersten Tag der Brut C dieser Versuchsserie fiel das Geschlechtsverhältnis unter den Kontrollwert; jedoch kann das abweichende Ergebnis hinreichend erklärt werden durch den dichteabhängigen Konkurrenznachteil der F_1 -Männchen, welche – entsprechend dem Kreuzungsplan –

mit dem mütterlichen X-Chromosom 6 Markiermutationen hemizygot erhalten, während die F_1 -Weibchen für alle Markiergene heterozygot werden. Ein qualitativ gleichlaufendes Muster im Geschlechtsverhältnis wurde bei Serie 6 (Fig. 3, 6000 R) aufgezeichnet, jedoch hielten sich hier im Verlauf der Bruten A-C die dichtebedingte Elimination von F_1 -Männchen und die strahlungsbedingte Inferiorität der F_1 -Weibchen annähernd die Waage. Immerhin lagen aber alle registrierten Punkte über dem Niveau der Kontrolle. Der Abfall im ♂:♀-Verhältnis von der ersten zur zweiten Replika in Brut A wird als Folge der wechselnden Dichteverhältnisse interpretiert, während der drastische neuerliche Anstieg von Brut C zu Brut D wohl zustande kommt, weil in Brut D der strahlungsbedingte Nachteil der Weibchen nicht mehr kompensiert wird durch die nur bei höherer Populationsdichte begrenzte Konkurrenzfähigkeit der Männchen.

In den Serien 11–13 (12 000 R) kam deutlich zum Ausdruck, dass mit Brut D eine Keimzellenklasse isoliert wurde, welche spezifisch strahlensensibler ist als die der vorangehenden prästerilen Bruten. Die Fertilität der bestrahlten Männchen war bei dieser Dosis allgemein stark herabgesetzt, so dass keine Übervölkerung in den Zuchtgefäßen zustande kam. Ein χ^2 -Kontingenztest zeigte, (1) dass sich in den Bruten A-C ein übereinstimmend hohes Geschlechtsverhältnis einstellte und (2) dass sich der Effekt in Brut D noch signifikant verstärkte. Die zusammenfassende Darstellung der Resultate in Fig. 4 zeichnet bei Berücksichtigung des Dosisunterschieds ein übereinstimmendes Bild des Brutmusters für das Geschlechtsverhältnis bei so unterschiedlichen Bestrahlungsdosen wie 3000 R und 12 000 R.

Induktionsrate des geschlechtsgekoppelten dominanten Letaleffekts: Da die dosisabhängige Verschiebung im Geschlechtsverhältnis nach Muller (1928b) auf der Erzeugung dominanter Letalfaktoren auf dem X-Chromosom beruht, kann modellmässig gesetzt werden, dass bei annähernd linearer Abhängigkeit zwischen Strahlungsdosis und Mutationserzeugung für die Frequenz ungeschädigter Chromosomen oder haploider Chromosomensätze die Beziehung der Poisson-Verteilung gilt: (1) $P_o = e^{-m} = e^{-kD}$, wobei e die Basis der natürlichen Logarithmen ist und m die mittlere Anzahl von Schadenfaktoren oder deren Äquivalent pro Chromosom oder Chromosomensatz bezeichnet; k steht für die Mutationsrate pro Dosiseinheit und D für die verwendete Dosis. Somit gilt für das Überleben weiblicher Individuen mit einem bestrahlten X-Chromosom und einem bestrahlten Autosomensatz (2) $P_{\text{♀}} = e^{-x D} \cdot e^{-a D}$; x steht hierbei für die Mutationsrate des spezifisch X-chromosomal Anteils und a für diejenige des übrigen grossen Rests im bestrahlten haploiden Genom. Für das Überleben von Männchen, die kein bestrahltes X erhalten, ergibt sich analog: (3) $P_{\text{♂}} = e^{-a D}$. Durch Division erhält man das Frequenzverhältnis überleben-

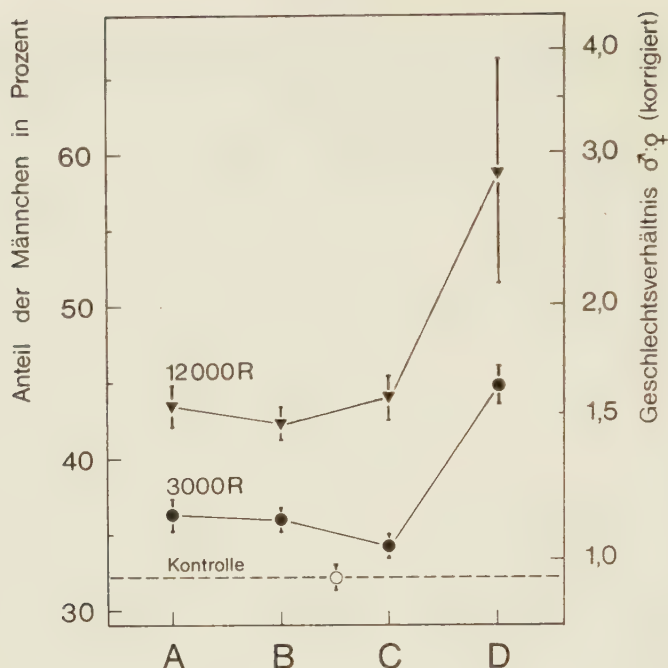


Fig. 4 Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses zugunsten der Männchen infolge Bestrahlung der Väter. Zu beachten ist der markante Anstieg des Männchenanteils in der letzten prästerilen Brut (D). Ordinate links: Gefundener Männchenanteil in den Versuchspopulationen. Ordinate rechts: Korrigiertes Geschlechtsverhältnis; durch Verdoppelung des gefundenen Männchenanteils wurde der Ausfall von $\ln(1)f^3$, $(Ax y m)f^3$ *ch bb/Y*-Männchen kompensiert.

der Tiere verschiedenen Geschlechts: (4) $P_{\delta}/P_{\pm} = e^{xD}$. Man erhält eine lineare Beziehung: (5) $\ln(P_{\delta}/P_{\pm}) = xD$. Der natürliche Logarithmus des ♂:♀-Verhältnisses ist also gleich der mittleren Induktionshäufigkeit einer geschlechtsgekoppelten dominanten Letalität bei einer bestimmten Dosis. Die Steigung der Geraden (5) entspricht der experimentellen Mutationsrate.

Bei der Charakterisierung der Dosisabhängigkeit des Geschlechtsverhältnisses, insbesondere zur Darstellung des Unterschieds zwischen den frühen Bruten und Brut D (Fig. 5), wurde Brut C ausgeschlossen, um die zwei Keimzellkategorien klar zu trennen. Für die Dosis 6000 R war der Versuch zu wiederholen, wobei mit drei sukzessiven Gelegen je Brut optimale Dichteverhältnisse für die aufwachsende F_1 erhalten wurden (Serie 8). In die Berechnungen sind aus Serie 6 nur die F_1 -Resultate jener Repliken eingegangen, deren mittlere Individuendichte pro Zuchtgefäß unter 20 lag. Zur Auswertung ist anzumerken, dass nach dem Kreuzungsplan, und wie die Kontrolle belegt, nicht ein Geschlechts-

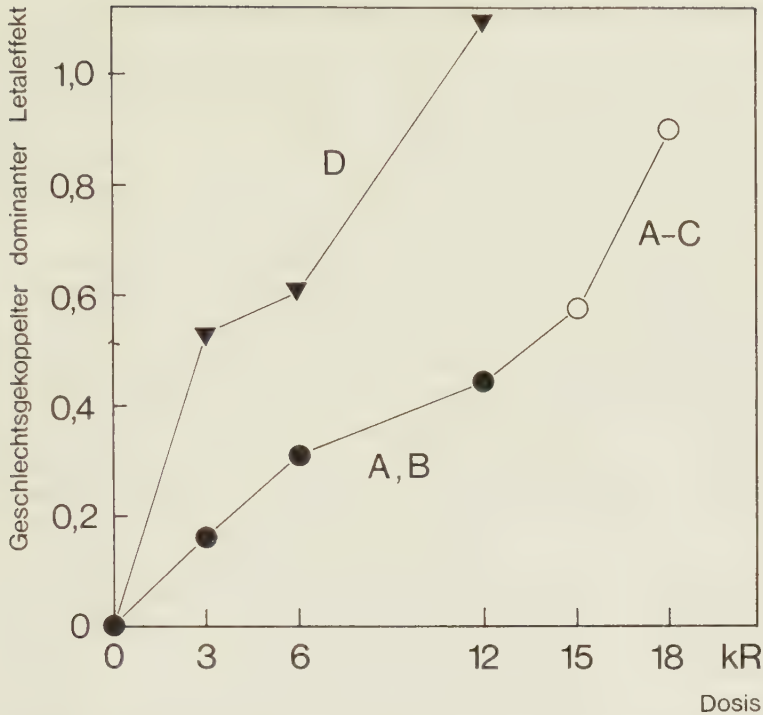


Fig. 5 Zusammenfassende Darstellung der Dosisabhängigkeit des geschlechtsgekoppelten dominanten Letaleffekts. Aus der strahlungsbedingten Verschiebung im Geschlechtsverhältnis der F_1 ist die durchschnittliche Anzahl dominanter Letalfaktoren beziehungsweise deren Äquivalent pro X-Chromosom errechnet worden. Brut D ist gegenüber den Bruten A und B durch eine ungefähr doppelt so hohe experimentelle Mutationsrate ausgezeichnet.

●, ▼ : Aus Serien der Experimente I und IV, korrigiert nach Kontrollexperiment II (Nullpunkt).
○ : Experiment V, ohne Korrektur umgerechnet; die Bruten A bis C sind zusammengefasst.

verhältnis von 1:1 erwartet wird, sondern ein abweichendes ♂:♀-Verhältnis $p:q$. Bei den Experimenten I und IV, also bis zur Dosis von 12000 R, wurde die entsprechend korrigierte Formel, $(5a) \ln(P_{\text{♂}}/P_{\text{♀}}) = xD + \ln p - \ln q$, angewendet und die empirischen Werte $p = 32,19\%$ und $q = 67,81\%$ aus Kontrolle II eingesetzt. Die Information für die höheren Dosen kommt aus den Resultaten des Experiments V. Die bestrahlten Männchen waren nur während der Bruten A-C fertil. Anscheinend wurden die Keimzellen der «empfindlicheren» Brut D durch die verwendeten Strahlungsdosen von 15 kR und 18 kR derart geschädigt, dass keine F_1 mehr aufkam. Wenn wie in diesem Falle die Eltern aus einem Wildstamm kommen, wird in der F_1 ein Geschlechtsverhältnis 1:1 erwartet. Durch die Bestrahlung der Väter mit 15 kR ergab sich ein erhöhter Männchenanteil von 64% (173♂/97♀), bei 18 kR stieg dieser auf 71% (106♂/43♀).

Obwohl das Zahlenmaterial klein ist und bei hohen Dosen die Gültigkeit von Formel (4) als Annäherung an die Realität sehr in Frage gestellt werden kann, sind die umgerechneten Ergebnisse in die Übersichtsdarstellung eingeschlossen worden, um die Tendenz des Kurvenverlaufs in diesem Dosisbereich anzuzeigen. Fig. 5 vermittelt den Eindruck, dass Brut D sich von den vorangehenden Bruten durch eine etwa doppelt so hohe Induktionsrate dominant-letalcr Schadenfaktoren unterscheidet.

Man vermutet, dass mit der strahlungsbedingten Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei den regulären F_1 -Nachkommen ein gleichartiger, dosisabhängiger Effekt bei den Ausnahme-Nachkommen parallel geht, deren Genom sich aus einem Nondisjunction-Kern mütterlicher Herkunft und einem bestrahlten, X- oder Y-führenden Spermakern zusammensetzt. Es ist eine induzierte Letalität sowohl dominanter als auch rezessiver Art bei den XO-Männchen zu postulieren, die bei den Weibchen nicht erwartet wird, angesichts der mütterlichen Herkunft ihrer beiden X-Chromosomen. Nichttrennen der X-Chromosomen ist aber zu selten, als dass eine Brutmusteranalyse angebracht wäre. Die Resultate aus den Experimentalbruten A-D wurden zusammengefasst und in einem χ^2 -Kontingenztest mit der Kontrolle verglichen (Tab. 5). Man findet eine, den theoretischen Erwägungen entsprechende, signifikante Verschiebung im Geschlechtsverhältnis der Nondisjunction-Nachkommen, und zwar ausgeprägter bei Bestrahlung der Väter mit 12000 R als bei einer solchen mit 3000 R.

Tab. 5 Veränderungen in der proportionellen Zusammensetzung der F_1 , bei Kreuzung inversionsheterozygoter Weibchen mit bestrahlten Männchen. ♀♀, ♂♂: reguläre Segreganten; ND♀♀, ND♂♂: Nondisjunction-Typen. Das Gesamt- χ^2 der 4x3-Tafel ist zerlegt in 3 Teil- χ^2 : dosisabhängige Verschiebungen des Geschlechtsverhältnisses bei den regulären Nachkommen (a) und bei den ND-Nachkommen (b); ein Rest- χ^2 für weitere Interaktionen (c) ist nicht signifikant ($0,05 < P < 0,1$). **: Signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%. FG: Anzahl Freiheitsgrade.

Experiment: Dosis (R):	II (Kontrolle) 0	I (Serie 3) 3000	IV (Serien 11-13) 12 000	χ^2	FG
♀♀	3421	7588	2815	(a) 128,59**	2
♂♂	1624	4355	2126		
(♀♀/♂♂)	(2,11)	(1,74)	(1,32)		
ND♀♀	81	234	136	(b) 13,09**	2
ND♂♂	109	242	91		
(ND♀♀/ND♂♂)	(0,74)	(0,97)	(1,49)		
ND♀♀/♂♂	0,050	0,054	0,064	(c) 4,88	2
ND♂♂/♀♀	0,032	0,032	0,032		
				146,57**	6

Unerwarteterweise veränderte sich das Verhältnis zwischen den Klassen, die kein bestrahltes X enthalten ($ND_{\text{♀♀/♂♂}}$), zugunsten der Nondisjunction-Typen. Die Nondisjunction-Männchen, bei denen der Hemizygotie wegen auch induzierte rezessive Letalfaktoren zur Letalität beitragen, gehen nicht stärker zurück, sondern nur in gleichem Masse wie die regulären Weibchen, bei denen einzig dominante, nicht aber rezessive Letalität als Eliminationsfaktor in Betracht kommt. Für die beiden genannten Tendenzen zeigte die χ^2 -Zerlegung allerdings keine statistische Signifikanz.

Geschlechtsgekoppelte rezessive Letalfaktoren: Der in Tab. 6 aufgeführte Brutmusterverlauf für die Induktion rezessiver Letalfaktoren zeigt zeitlich parallel eintretende Frequenzänderungen in den Experimentalserien mit 3000 R (Serie 3) und 6000 R (Serie 6). Die ersten drei Bruten sind in beiden Fällen unter sich nicht signifikant verschieden. Die anschliessende, letzte prästerile Brut D erbrachte jedoch gegenüber den vorangegangenen Bruten eine Verdoppelung der Häufigkeit rezessiv-letalere X-Chromosomen. Diese statistisch gesicherte Änderung ist in Parallele zu setzen mit dem beobachteten Wechsel des Geschlechtsverhältnisses in diesem Zeitabschnitt der Versuche.

Wegen der beinahe absoluten Sterilität der Männchen während der Bruten E und F konnten erst die Bruten G und H wieder untersucht werden. In dieser poststerilen Periode wurden die geringsten Letalfrequenzen beobachtet. Bei beiden Serien war der Anteil rezessiv-letalere X-Chromosomen in Brut G höher als in Brut H, aber nur im 3000-R-Versuch war der Unterschied signifikant. Bei dieser Serie gehörten die beiden ersten Tage der drei Tage dauernden Brut

Tab. 6 Brutmuster für die Röntgeninduktion geschlechtsgekoppelter rezessiver Letalfaktoren. Angegeben ist der prozentuale Anteil letaler X-Chromosomen $\pm$ einfache Streuung in den fertilen Bruten A bis D sowie G und H, induziert durch 3000 R (Serie 3) und 6000 R (Serie 6). In Klammern steht die Anzahl getesteter Chromosomen.

Bruten	Serie 3	Serie 6
A	$7,5 \pm 1,5$ (306)	$8,6 \pm 1,6$ (304)
B	$9,9 \pm 1,5$ (393)	$11,8 \pm 1,9$ (304)
C	$8,1 \pm 1,4$ (370)	$10,2 \pm 1,9$ (254)
A + B + C	$8,6 \pm 0,9$ (1069)	$10,2 \pm 1,0$ (862)
D	$18,2 \pm 2,5$ (242)	$21,9 \pm 4,2$ (96)
G	$7,6 \pm 2,8$ (92)	$4,4 \pm 1,2$ (319)
H	$3,0 \pm 1,0$ (302)	$3,1 \pm 1,0$ (291)
G + H	4,1	3,8

G noch der sterilen Periode an. Die bei G notierte Letalfrequenz charakterisiert daher ausschliesslich den ersten poststerilen Tag, auf den Brut H mit einer nicht einmal mehr halb so hohen Mutationshäufigkeit folgte. Die Brut G des 6000-R-Versuchs war nicht durch täglichen Futterwechsel unterteilt. Der Beginn der poststerilen Periode kann deshalb nicht auf den Tag genau festgestellt werden, jedoch besteht ein indirekter Hinweis, dass die sterile Phase früher zu Ende kam, da die F_1 -Nachkommenschaft der Brut G wesentlich zahlreicher ausfiel als im Versuch mit der niedrigeren Dosis von 3000 R. Das untersuchte Material der Brut G bei 6000 R war wahrscheinlich heterogen und umfasste neben Spermien des ersten poststerilen Tags auch jüngere, bei denen man aufgrund des Resultats bei 3000 R genetische Schädigungen seltener erwartet. Übereinstimmend wurden bei beiden Serien in der letzten untersuchten Brut H etwa dreimal weniger rezessiv-letale X-Chromosomen registriert als in den frühen Bruten A-C.

Aus dem Ergebnis geht hervor, dass die strahlenempfindlichste, sterile Phase flankiert ist von je einer Brut, deren Mutationsraten höher sind als die der vorangehenden beziehungsweise nachfolgenden Periode. Nach zunehmender Letalfaktorenhäufigkeit geordnet können zwar fünf Empfindlichkeitskategorien unterschieden werden ($H < G < ABC < D < EF$ steril), doch wird man das Brutmuster mit einer kontinuierlich ablaufenden Spermatogenese in Verbindung bringen, bei der sich die Keimzellen in Übergangsphasen unter relativ abruptem (Brut G) oder eher gleitendem (Brut D) Stadienwechsel weiterentwickeln.

Ein brutspezifischer Phänotyp: Wie bei Bestrahlungsexperimenten zu erwarten ist, wurden in der F_1 induzierte Mutationen und Radiomorphosen manifest. Sie waren jedoch, ausser bei Verwendung sehr hoher Dosen, eher selten. Eine Ausnahme von dieser Regel erscheint erwähnenswert, da sie wahrscheinlich den redundanten *bobbed*-Locus (Ritossa et al., 1966) betrifft und sich brut- und geschlechtsspezifisch äusserte.

F_1 -Weibchen mit sehr kurzen Borsten, steil aufgerichteten Scutellaren und meist extremem «edging» der Abdominaltergite wurden mit grosser Häufigkeit in den beiden poststerilen Bruten der Serien 3 und 6 gefunden. Eine Stichprobe von 1288 Weibchen (Serie 6, Brut H) enthielt 3,7% in dieser Weise geschädigte Individuen. Versuche zur Nachzucht mit 105 solcher Weibchen verliefen negativ; absolute Sterilität gehört zum Schädigungsmuster. Das Syndrom, zu welchem auch eine Reduktion der braunen Augenfarbstoffe gehört, entspricht der pleiotropen Manifestation extremster *bobbed*-Allele von *D. hydei*. In den prästerilen Bruten konnten, bei welcher Dosis auch immer, nie Weibchen gefunden werden, welche diesen unverwechselbaren Defekt besaßen. Bei den Männchen war ein gleicher oder ähnlicher Phänotyp auch in den poststerilen Bruten nicht auffindbar.

Die Aufdeckung des unerwarteten Phänomens mag dem zufälligen Umstand zu verdanken sein, dass die bestrahlten Männchen mit homozygoten *hobbed*-Weibchen gekreuzt wurden, so dass durch Schädigung des bestrahlten X-Chromosoms X/bbX^{bb} -Weibchen entstanden. Die hohe Frequenz des Ereignisses, die geringe Variabilität der Expression und die ausnahmslos vorliegende Sterilität sprechen dafür, dass das induzierte *hobbed* nicht eine Mutation am Genlocus darstellt, sondern eine grössere Deletion. In der Mutagenese wäre ein Bruchereignis zu postulieren, wobei das X-Chromosom ganz oder partiell den rechten heterochromatischen Arm verlieren würde, der vermutlich distal den Nucleolus-Organisator trägt (van Breugel, 1970). Andere Voraussetzungen beim Y-Chromosom könnten ursächlich am Fehlen von X/bbY^{bb} -Männchen beteiligt sein (Meyer et al., 1974).

3. Mutationsrate rezessiver Letalfaktoren in den frühen Bruten³

Nach Bestrahlung von Männchen von *D. melanogaster* stellten verschiedene Autoren fest, dass sich die Induktionshäufigkeit rezessiver Letalfaktoren proportional zur eingestrahnten Dosis erhöhte (Zusammenfassung bei Stubbe, 1938). Timoféeff-Ressovsky (1939) bestätigte den Befund anhand eines umfangreichen Versuchsmaterials. In erster Annäherung darf diese empirische Regel auch heute noch eine gewisse Gültigkeit beanspruchen (Sobels, 1972). Freilich sind auch Vorbehalte zu machen, weil der Dosisbereich, die Einheitlichkeit des bestrahlten Materials und die stadienspezifische Empfindlichkeit mit eine Rolle spielen.

Lea (1946) legte theoretisch dar, dass Methoden, welche ganze Chromosomen auf Letalität prüfen, infolge eines Sättigungseffekts zu abgeflachten Dosisabhängigkeitskurven führen, weil mit zunehmender Mutationsdichte im Testmaterial die als einfach-letal registrierten Chromosomen mit zwei oder mehreren Letalmutationen belastet sein können, die Anzahl mutierter Gene also unterschätzt wird. Für die Induktionshäufigkeit der Einzelmutationen selbst nimmt Lea eine lineare Abhängigkeit von der Dosis an, ungeachtet ob diese an Umbauten der Chromosomenstruktur beteiligt sind oder nicht. Nach Muller et al. (1954) und Traut (1963) ist jedoch nicht eine strikt lineare Abhängigkeit anzunehmen, vielmehr ergeben sich in der Praxis scheinbar lineare Beziehungen oft als Resultante aus verschiedenen Dosiseffektkurven mit einer exponentiell ansteigenden Komponente, der jedoch kompensatorisch andere Faktoren entgegenwirken. Nach Ansicht dieser Autoren können annähernd lineare, vor allem aber abgeflachte oder gestuft ansteigende Kurven zustande

³ Vorläufige Mitteilung an der Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Vererbungs-forschung 1971 (Frei, 1972).

kommen, wenn das bestrahlte Keimzellenmaterial im Bezug auf die Strahlenempfindlichkeit heterogen ist, da höhere Dosen selektiv die jeweils empfindlichsten Zellklassen zu eliminieren vermögen. Bei Restriktion auf möglichst altersgleiche Zellkategorien der postmeiotischen Spermatogenese sind in begrenzten Dosisbereichen zum Teil stufenfreie Dosiseffektkurven erhalten worden, welche etwas stärker als proportional zur Dosis ansteigen oder doch zum mindesten den Sättigungseffekt nicht in Erscheinung treten lassen (Lefevre et al., 1964b; Traut, 1963).

Tab. 7 Dosisabhängigkeit der Frequenz röntgeninduzierter rezessiver Letalfaktoren. Nach Lea (1946) wurden aus dem prozentualen Anteil letaler X-Chromosomen die mittlere Anzahl induzierter Letalmutationen pro X-Chromosom (mD) und die Mutationsrate (m) pro X-Chromosom und 1000 R Doseinheit errechnet. Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus den Serien 1–10 des Hauptexperimentes I zusammen.

Dosis	Häufigkeit letaler Chromosomen	mD	m
Kontrolle	0/ 768		
1 500 R	30/ 740 = $4,05 \pm 0,73 \%$	0,0413	0,0276
3 000 R	200/2470 = $8,10 \pm 0,55 \%$	0,0845	0,0282
6 000 R	163/1563 = $10,43 \%$ (heterogen)	0,1102	0,0184
12 000 R	34/ 166 = $20,48 \pm 3,13 \%$	0,2297	0,0191

Die Untersuchung des Brutmusterverlaufs bei *D. hydei* erbrachte bei allen verwendeten Kriterien ausgeglichene, homogene Resultate für die Mutabilität in den ersten drei Bruten (A–C). Diese erschienen daher am geeignetsten für eine Bestimmung der Dosisabhängigkeit. In Tab. 7 sind die Häufigkeiten rezessiv-letaler X-Chromosomen zusammengefasst, wie sie für jede Dosisstufe registriert wurden. Kontrollserie 1, ohne Bestrahlung, stellte die Zuverlässigkeit des Tests insofern sicher, als keine letalen Chromosomen auftraten. Die Versuche mit 1500 R und mit 3000 R ergaben eine Verdoppelung der Häufigkeit letaler Chromosomen bei der höheren Dosis. Bei einer weiteren Dosisverdoppelung auf 6000 R erbrachten die zusammengefassten Serien eine geringere Ausbeute, als nach der empirischen Proportionalitätsregel anzunehmen wäre. Zunächst war zu prüfen, ob sich diese Inkongruenz aufgrund des Sättigungseffekts eingestellt hatte. Die entsprechende Umrechnung (Lea, 1946) zeigt jedoch erneut einen relativ abgesenkten Wert für die Dosis von 6000 R. Die in je drei Serien wiederholten Häufigkeitsbestimmungen bei 3000 R (Serien 3–5) und 6000 R (Serien 6–8) ergaben überdies Differenzen, sowohl zwischen den Bruten als auch zwischen den dosisgleichen Experimentalserien (Fig. 6), jedoch erwies sich die Heterogenität im χ^2 -Kontingenztest lediglich für die Serien bei

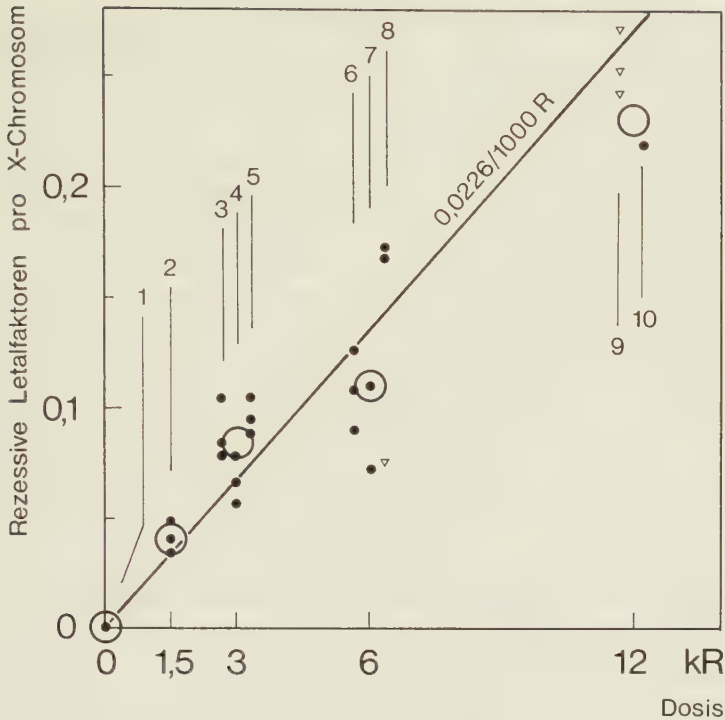


Fig. 6 Dosisabhängigkeit der Röntgeninduktion rezessiver Letalfaktoren auf den X-Chromosomen in Spermien der Bruten A-C. Ausgefüllte Kreise entsprechen den Resultaten einzelner Bruten, die je 100–370 getestete Chromosomen umfassen. Mit Dreiecken sind Bruten geringen Umfangs (unter 30 Testchromosomen) wiedergegeben. Ziffern bezeichnen die Serien 1–10 des Experimentes I. Leere Kreise stellen Durchschnittswerte dar. Eine durch den Nullpunkt gelegte theoretische Gerade vermittelt mit ihrer Steigung eine Schätzung der Mutationsrate. Alle Angaben sind nach Lea (1946) korrigiert (siehe Text).

6000 R als signifikant. Bei 12000 R (Serien 9 und 10) waren die Versuchsdaten von geringerem Umfang. Statistisch beurteilt fielen die Ergebnisse einheitlich aus. Gleich dem Resultat bei 6000 R ergab sich aber eine relativ zu niedrige Letalfaktorenhäufigkeit.

Zur Bestimmung der experimentellen Mutationsrate im untersuchten Dosisbereich wurde eine Gerade durch den Nullpunkt an die Daten angepasst (Snedecor et al., 1967, S. 168). Ihre Steigung beträgt 0,0226 induzierte Letalfaktoren pro X-Chromosom auf 1000 R Dosisdifferenz (Fig. 6) oder ohne die von Lea (1946) vorgeschlagene Korrektur für den Sättigungseffekt 2,15% letale X-Chromosomen je 1000 R. Allerdings zeigt der Goodness-of-fit-Test eine signifikante Abweichung der Versuchsergebnisse vom linearen Dosisabhängigkeitsmodell. Die ermittelte Mutationsrate stellt somit lediglich eine grobe Pei-

lung der durchschnittlichen, dosisabhängigen Frequenzzunahme in einem für *Drosophila* recht weiten Dosisbereich dar, die als Schätzung für den Bereich bis 3000 R zu niedrig, für den Bereich ab 6000 R zu hoch erscheint.

Es mag auf einer Zufälligkeit in der genetischen Organisation von *D. melanogaster* beruhen, dass sich bei diesem Untersuchungsobjekt die Dosisabhängigkeiten verschiedener Mutationsformen mit rezessivem Letaleffekt, nämlich Locusmutationen und Chromosomenumbauten, zu einer annäherungsweise linearen Beziehung summieren. Bei *D. hydei* sind Zahl und Form der Chromosomen verschieden, wodurch andere Voraussetzungen für die Realisation von Chromosomenumbauten gegeben sein könnten. Im Bezug auf die Induktionshäufigkeit solcher Mutationsformen in den postmeiotischen Spermatogenesestadien scheint sich diese Art von anderen zu unterscheiden (Fiala et al., 1952). Es kann deshalb nicht zum vorneherein als sichere These gelten, dass das dosisabhängige Verhältnis zwischen den Induktionshäufigkeiten verschiedener Mutationsformen auch bei *D. hydei* zu einer linearen Dosisabhängigkeit für die Gesamtheit der erzeugten Letalmutationen führt. Die verhältnismässig geringe Zunahme bei der Dosisverdoppelung von 3000 R auf 6000 R könnte zum mindesten teilweise darauf beruhen, dass bis zur Dosis von 3000 R eine für Locusmutationen geltende Dosisabhängigkeit vorherrscht, während bei den Dosen von 6000 R und 12000 R die für Chromosomenaberrationen festgestellte Abhängigkeit mit exponentiellem Charakter an Bedeutung gewinnt (Timoféeff-Resovsky, 1939; Lea, 1946; Traut, 1963). Für die Locusmutationen wäre eine Kurve zu postulieren, die sich im hohen Dosisbereich abflacht.

Bei der gewählten Methode zur Gewinnung des Testmaterials, über eine Periode von 8–9 Tagen, ist indessen nicht ausgeschlossen, dass eine bestehende, aber anderweitig nicht in Erscheinung tretende Uneinheitlichkeit im bestrahlten Keimzellenmaterial zu einer differentiellen Elimination (Muller et al., 1954) der am empfindlichsten getroffenen Kategorien geführt hat und dass dadurch die Mutationshäufigkeit bei 6000 R einen relativ niedrigen Wert annahm.

Diskussion

1. Brutmuster und Spermatogenese

Bei *Drosophila melanogaster* führt die Behandlung mit ionisierenden Strahlen zu einer vorübergehenden Sterilität der bestrahlten Männchen. Obwohl die Dauer und das zeitliche Eintreffen dieser Periode entsprechend den biologischen Gegebenheiten und den experimentellen Bedingungen etwas variieren (Fahmy et al., 1964; Sobels, 1963), kann festgehalten werden, dass mit einer Dosis um 3000 R die Sterilität während 4 bis 5 Tagen zu beobachten ist, näm-

lich um den 5. oder 6. Tag nach Bestrahlung einsetzt und am 9. oder 10. Tag abbricht (Bateman, 1956; Hannah-Alava, 1965; Lüning, 1952). Dem Phänomen liegt eventuell ein Abtöten bestimmter Entwicklungsstadien der Spermatogenese, sicher aber zur Hauptsache induzierte dominante Letalität zugrunde, wobei die genetische Grundlage nicht während der ganzen Sterilitätsperiode ein und dieselbe zu sein braucht (Sävhaugen, 1963).

Im Anschluss an die Sterilitätsperiode, vom 10. oder 11. Tag an, werden offenbar Spermien erfasst, die als definitive Spermatogonien bestrahlt wurden (Olivieri et al., 1964; Puro, 1964). *D. melanogaster* benötigt rund 10 Tage für den gesamten Spermatogeneseprozess, von der prämeiotischen DNS-Synthese bis zur Reife der Spermien (Chandley et al., 1962; Kaplan et al., 1960, 1964; Kaufmann et al., 1963; Martin, 1965; Olivieri et al., 1965). Bei *D. hydei* erscheint dieser Ablauf im allgemeinen verlangsamt. Das Ende der sterilen Phase stellte sich um den 21. Tag ein, woraus zu entnehmen ist, dass die Entwicklung etwa doppelt soviel Zeit in Anspruch nimmt als bei *D. melanogaster*. Hennig (1967) benutzte Tracer-Methoden zur Bestimmung der Chronologie in der Spermatogenese von *D. hydei*. Für den gesamten Ablauf, von der Inkorporation des injizierten ^3H -Thymidins in den definitiven Spermatogonien bis zum Erscheinen radioaktiv markierter junger Spermienbündel, wird in dieser Arbeit eine Zeitspanne von 12 bis 13 Tagen angegeben. Der Unterschied zur Bestimmung der Spermatogenesedauer, wie sie aus dem Brutmuster zutage trat, ist dem Umstand zuzuschreiben, dass bei Hennig nur etwa 3 Tage der postmeiotischen Spermiogenese berücksichtigt sind. In Wahrheit dürften die Meioseprodukte jedoch schätzungsweise 12–14 Tage bis zum Erreichen der vollen Reife benötigen. Dieser Schluss liegt nahe, da sich bei *D. melanogaster* die Spermatiden in der Streckungsphase und die älteren Spermatocyten als derart strahlenempfindlich gegenüber Dosen über 1000 R erwiesen, dass nach Bestrahlung von Präpuppen (Spermatocyten) und jungen Puppen (Spermatiden) fast absolute Sterilität der geschlüpften Männchen eintrat (Kishin, 1955). Im Adultstadium bestrahlte Männchen von *D. hydei* blieben bei Anwendung von Dosen wie 3000 R und 12000 R aber zunächst während einer Periode von 12 Tagen fertil, wenn auch die letzten drei Tage (Brut D) vor der sterilen Phase eine vergleichsweise reduzierte Nachkommenschaft erbrachten. Erst nach Bestrahlung mit sehr hohen Dosen, 15 kR und 18 kR, wurden die Tiere bereits in Brut D steril.

Männliche Keimzellen von *D. hydei* benötigen rund 10 Tage für die Entwicklung vom Spermatocytenstadium 0 bis zum Abschluss der Spermatidenstreckung, wobei ungefähr 7 Tage auf die Spermatocytenentwicklung entfallen (Hennig, 1967). In Berücksichtigung dieses Zeitplans lassen sich Stadienfolge und Brutmuster-Ergebnisse (Fig. 7, A–H) angenähert zur Deckung bringen. Zu erwähnen bleibt, dass reife Spermien (im Sinne von Lefevrø et al., 1964a, b)

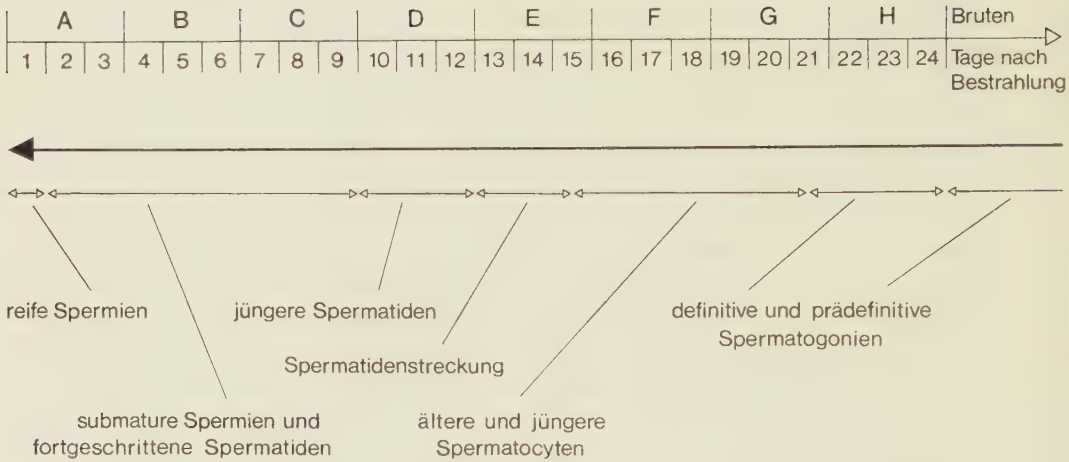


Fig. 7 Chronologie der Stadienfolge in der Spermatogenese von *D. hydei*. Grundlage der Darstellung bildet die Interpretation des stadienspezifischen Mutationsverhaltens der Keimzellen (siehe Diskussion), doch sind auch die Angaben von Hennig (1967) berücksichtigt.

durch Bestrahlung juveniler Imagines wahrscheinlich aus den Brutmuster-Experimenten ausgeschlossen werden konnten.

(A–C) Während 9 Tagen nach Bestrahlung werden Spermien reif, die als junge Spermien und weitfortgeschrittene Spermatiden bestrahlt wurden. Da im langgewundenen Hodenschlauch von *D. hydei* Spermienbündel ähnlichen Entwicklungsalters weit voneinander verstreut angetroffen werden können (Hennig, 1967), muss bei der Fraktionierung mit der Brutmuster-Methode mit gewissen Unzulänglichkeiten gerechnet werden, die sich aus der Vermischung von bestrahlten Keimzellen ungleichen Entwicklungsalters mit verschiedener Empfindlichkeit ergeben können. Das Geschlechtsverhältnis, das infolge der Bestrahlung zugunsten der männlichen Nachkommenschaft verschoben wurde, wie auch die Mutationsrate für rezessive Letalfaktoren zeigten aber für drei aufeinanderfolgende Bruten zu je 3 Tagen keine signifikante Unterschiede. Einzig das Auftreten einer Stufe in der Dosisabhängigkeitskurve für rezessive Letalfaktoren kann im Sinne von Traut (1963, 1964) als Hinweis auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit verstanden werden.

(D) Durch alle drei Testkriterien – Fertilität, Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses und Induktionshäufigkeit rezessiver Letalfaktoren – hob sich die Spermienfraktion der letzten prästerilen Brut von den vorangegangenen ab. In Anlehnung an die Interpretation gleichartiger Befunde bei *D. melanogaster* (Auerbach, 1954; Hannah-Alava, 1968; Lünig, 1952; Moriwaki et al., 1967; Sävghagen, 1963; Sobels, 1965a) ist anzunehmen, dass die ausgeprägte Sensibili-

tät die Erfassung jüngerer Spermatiden kennzeichnet. Ob dabei auch jüngste Spermatiden der Streckungsphase oder gar nur diese inbegriffen sind, kann angesichts der zum Teil gegensätzlichen Auffassungen über die Situation bei *D. melanogaster* nicht entschieden werden (Fahmy et al., 1964; Fritz-Niggli, 1972; Hannah-Alava, 1965; Kishin, 1955; Lefevre et al., 1964a; Olivieri et al., 1964).

(E–G) Die beobachtete Dauer der sterilen Periode, die bei *D. hydei* etwas länger ausfiel als der Zeitabschnitt, den die Spermatocytenentwicklung allein einnimmt (Hennig, 1967), ist ein Argument zugunsten der Annahme, wonach die sterile Phase mit der Strahleneinwirkung auf jüngste Spermatiden und auf Spermatocyten zusammenhängt. Man beachtet dabei auch jene fundierte Meinung, derzufolge bestrahlte junge Spermatocyten anschliessend an die Periode markantester Sterilität als reife Spermien frei werden. Offenbar sind hauptsächlich die älteren Spermatocyten und die meiotischen Teilungsstadien intensivster Strahlenschädigung unterworfen, die – in möglichem Gegensatz zur Situation bei Spermatiden – zum Teil auch über Zell-Letalität zu Unfruchtbarkeit führen kann (Fritz-Niggli, 1959, 1972; Kishin, 1955; Olivieri et al., 1964; Puro, 1964; Sobels, 1965b). Nach Röntgenbestrahlung mit rund 3000 R beobachtete Hennig (1967) eine morphologische Veränderung oder gar Zerstörung der für den Spermatogeneseablauf wichtigen Lampenbürstenstrukturen des Y-Chromosoms in allen Stadien der Spermatocytenentwicklung, irreversibel in den älteren, jedoch regenerierbar in den jüngeren Stadien. Auch bei *D. melanogaster* wird über morphologisch erkennbare, transitorische Strahlenschäden in Spermatocyten mit parallel auftretenden Hemmungserscheinungen im Entwicklungsgang berichtet (Fritz-Niggli, 1972; Kaufmann et al. 1963; Martin, 1965). Wohl infolge der notwendigen Erholungspause werden die betreffenden Keimzellen in der Entwicklung geringfügig zurückgehalten. Es könnten folglich auch jüngere Spermatocyten, ohne unwiederbringlich geschädigt zu sein, zu einer Verlängerung der sterilen Phase beitragen.

(G, H) So ist es nicht ausgeschlossen, dass unter Anwendung der Brutmuster-Technik bei *D. hydei* im poststerilen Abschnitt anfänglich eine gemischte Spermengruppe erfasst wurde, die aus strahlenempfindlicheren jungen Spermatocyten und relativ resistenten definitiven Spermatogonien hervorging. Als entsprechender Hinweis kann die Feststellung gelten, dass die erste poststerile Brut mehr rezessiv-letale Mutationen erbrachte als die zweite. In beiden Bruten wurde aber zusätzlich auch eine spezifische Spermienklasse manifest, welche sich durch einen unverwechselbaren Phänotyp (*bobbed*) in der Nachkommenschaft anzeigte. Die Beurteilung des Syndroms, das auf die weibliche Nachkommenschaft beschränkt ist, gibt Recht zur Annahme, dass ein induzierter Verlust des X-chromosomalen *bobbed*-Locus die genetische Grundlage bildet. Eine analoge

Elimination der *bobbed*⁻-Information aus dem Y-Chromosom war im Material nicht nachweisbar. Es ist wohl der spezifischen Architektur des X-Chromosoms bei *D. hydei* (van Breugel, 1970) zuzuschreiben, dass bei *D. melanogaster* das homologe Phänomen nie beobachtet wurde. Das brutspezifische Auftreten, zu Beginn der poststerilen Periode (H. Beck, persönliche Mitteilung), erinnert allerdings an andere strahleninduzierbare Veränderungen der Chromosomenstruktur, die vielfach heterochromatische Bereiche betreffen: induziertes Crossing-over, Stückverluste beim Y-Chromosom, Produktion von Compound-Autosomen und ähnliche Mutationsformen, die bei *D. melanogaster* mit der Brutmuster-Technik untersucht worden sind (Fahmy et al., 1964; Olivieri et al., 1964; Leigh, 1969; Leigh et al., 1970).

2. Mutationsraten, gemessen an rezessiven Letalfaktoren

Vergleichende Untersuchungen über die Mutationsrate bei bestrahlten männlichen Keimzellen von verschiedenen *Drosophila*-Arten sind spärlich erschienen und berücksichtigen lediglich die von Harris (1929) aufgedeckte unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von relativ resistenten Spermatogonien gegenüber sensibleren älteren Entwicklungsstadien. Von Timoféeff-Ressovsky (Zusammenfassung 1939) wurde für *D. melanogaster* eine Rate von 2,8 % rezessiv-letaler X-Chromosomen je 1000 R ermittelt. Diese umfangreiche Untersuchung wurde später von Traut (1963) einer kritischen Revision unterzogen, wobei einerseits die quantitative Aussage im wesentlichen bestätigt wurde, andererseits jedoch deutlich gemacht wurde, dass die Zusammenfassung unterschiedlich empfindlicher Stadien zu einer relativ hohen Schätzung des Mutabilitätsparameters geführt hatte. Die geringste Ausbeute an rezessiven Letalfaktoren von postmeiotischen Stadien erhielt Traut am zweiten und dritten Tag nach Bestrahlung. Es errechnet sich für diese Bruten eine durchschnittliche Mutationsrate von 2 %, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den zeitlich gleich gelegenen Bruten in Versuchen von Lefevre et al. (1964a, b). Von diesen Verfassern wurde die minimalste Schätzung von 1,6 % nach Bestrahlung 3 Tage alter Männchen gefunden. Dies dürfte zurückzuführen sein auf ein besonders reichliches Angebot an relativ resistenten älteren Spermatiden und submaturen Spermien bei Männchen dieses Alters. Wenn ausgereifte Spermien und jüngere Spermatiden in das Untersuchungsmaterial eingehen, ist mit Mutationsraten zu rechnen, die abhängig vom Anteil dieser empfindlichen Stadien um einiges höher ausfallen können. In der vorliegenden Untersuchung von *D. hydei* sind Massnahmen getroffen worden, um unter Ausschluss der empfindlicheren Stadien zu einer Schätzung der Mutationsrate für die Stadiengruppe submaturer Spermien und älterer Spermatiden zu gelangen. Der errechnete Durchschnitts-

wert von $2,26 \cdot 10^{-2}$ liegt innerhalb der Variationsbreite der Referenzwerte, wie sie bei *D. melanogaster* gefunden wurden. Eine minimale Rate von $1,9 \cdot 10^{-2}$ resultierte aus den Experimenten mit den höheren Dosen 6000 R und 12000 R, die den Werten für die resistentesten Stadien der Spermiogenese von *D. melanogaster* sehr nahekommmt. Für die Dosen von 1500 R und 3000 R ergab sich eine signifikant höhere Schätzung von $2,8 \cdot 10^{-2}$, die numerisch eher mit Timoféeff-Ressovskys Resultat in Einklang steht. Wie Traut (1963, 1964) ausführt, erfolgt bei Anwendung zunehmend höherer Dosen unter gewissen Voraussetzungen eine progressive Auslese zugunsten der resistentesten Zellkategorie in einer heterogenen Gruppe. So betrachtet kann gefolgert werden, dass die relativ niedrige Mutationsrate bei Anwendung hoher Dosen für eine einheitliche und relativ resistente Zellklasse typisch ist und dass bei den niedrigeren Dosen ein Durchschnittswert erhalten wurde, der eine heterogene Gruppe mit Einschluss etwas empfindlicherer Keimzellen charakterisiert. Diese Interpretation, die auf einer Stufenbildung in der Dosisabhängigkeitskurve basiert, kann hingegen nicht weiter ausgedehnt werden, wenn etwa entschieden werden sollte, ob die anscheinend vorliegende Heterogenität im Zusammenhang steht mit einer chronologisch ändernden Strahlenempfindlichkeit in jenem Entwicklungsabschnitt, der durch gewollte Einschränkungen hier elektiv untersucht worden ist.

Auf die eingangs gestellte Frage, ob systematisch weitentfernte Verwandte innerhalb des Genus *Drosophila* unterschiedliche Reaktionsnormen auf mutagene Strahlung zeigen, erscheint abschliessend eine Antwort möglich, die jedoch einschränkend Bezug nimmt auf das Kriterium der Induktion rezessiver Letalfaktoren auf dem X-Chromosom. Die beiden Arten *D. melanogaster* und *D. hydei* zeigen sehr ähnliche Mutationsraten, trotzdem ihre X-Chromosomen in der Länge ihrer Genkarten um etwa den Faktor zwei divergieren. Auch *D. funebris* zeigte im Vergleich mit *D. melanogaster* eine im Prinzip identische Mutationsrate für männliche Keimzellen (Keller et al., 1937). Allerdings fehlt eine genauere Umschreibung des in die Untersuchung einbezogenen Keimzellenmaterials. Ebenso wie *D. hydei* besitzt *D. funebris* eine Rekombinationskarte des X-Chromosoms, welche mit 150 Morgan-Einheiten jene von *D. melanogaster* weit übertrifft (Perje, 1955). In Metaphase-Präparaten von *D. funebris* überrascht die für *Drosophila* sonderbare Erscheinung eines übergrossen acrocentischen X-Chromosoms. Es unterscheidet sich im Spiralisationsverhalten, in den färberischen Eigenschaften sowie in den Anaphasebewegungen von den relativ kleinen Autosomen (Metz, 1926; Metz et al., 1923). Seine cytologische Erscheinungsform ist wohl aufgrund reichlich anwesenden Heterochromatins so aussergewöhnlich. Im Gegensatz hiezu verhält sich der euchromatische Arm des metacentrischen X-Chromosoms von *D. hydei* in der Mitose ähnlich wie die Autosomen. Der heterochromatische Arm ist deutlich abgesetzt und zeigt

strukturelle Parallelen zum Y-Chromosom (van Breugel, 1970). Wiederum eine andere Situation trifft man bei *D. melanogaster* mit einem acrocentrischen X, das sich in einen heterochromatischen proximalen und einen euchromatischen distalen Teil gliedert (Cooper, 1959). So grundlegend verschieden die Morphologie der X-Chromosomen bei den angeführten Arten auch erscheinen mag, im Bezug auf die Mutationsrate scheint dies eher belanglos zu sein. Man gewinnt den Eindruck, dass innerhalb des Genus *Drosophila* das Euchromatin als hauptsächlicher Träger rezessiver Letalfaktoren in Frage kommt und dass der Bestand an Genen, der bei den bis heute untersuchten Arten in diesen Teil des X-Chromosoms eingeschlossen ist, kaum variiert. Längenunterschiede bei den Rekombinationskarten stehen anscheinend in keinem direkten Zusammenhang mit der Anzahl vorhandener Gene, die potentiell rezessiv-letale Erbinformation tragen können.

Mit solchen Überlegungen kontrastiert andererseits die hohe Mutationsrate von *D. subobscura*, die Christie (1939) ermittelte. Diese Species ist aussergewöhnlich, da die Speicheldrüsenchromosomen kein Chromozentrum ausbilden, indessen aber vielfältig Heterochromatin interkalar zwischen euchromatische Chromosomenabschnitte eingestreut ist (Buzzati et al., 1955; Hauschteck-Jungen et al., 1972). Die Rekombinationskarte des acrocentrischen X misst rund 150 Morgan-Einheiten (Spurway, 1945). Aus den zugänglichen Daten leitet sich eine Mutationsrate von mindestens 4% ab, wenn die relativ hohe Spontanrate und ein bedeutender Anteil zweifelhafter Letalmutationen («probable lethals») in Abzug gebracht werden. Dieser Wert, der weit über den zeitgenössischen Schätzungen von Timoféeff-Ressovsky und Mitarbeitern für *D. melanogaster* liegt, ist aber mit Zurückhaltung zu betrachten, nachdem wir heute einen guten Überblick über die unterschiedliche Empfindlichkeit der Keimzellen in der Spermiogenese besitzen und Maynard Smith (1956) die Fortpflanzungsbiologie von *D. subobscura* untersucht hat. Paarungsbereite Weibchen dieser Art kopulieren in der Regel nur ein einziges Mal für eine Reproduktionsperiode von rund 3 Wochen. Christie setzte jeweils 4 bestrahlte Männchen zu 2 virginalen Weibchen; es ist deshalb wahrscheinlich, dass der erste und vermutlich einzige Schub von Spermien, der von den Männchen übertragen wurde, hauptsächlich die bereits bei der Bestrahlung reifen Spermien enthielt. Nach Lefevre et al. (1964b) erwartet man für reife Spermien auch bei *D. melanogaster* eine Mutationsrate von 4% je 1000 R. Damit wird ein letzter Hinweis vermutlich hinfällig, wonach zwischen der artspezifischen genetischen Organisation und der experimentellen Mutationsrate eine besondere Beziehung bestehen könnte.

3. «Dominante Letalfaktoren»

Unter gewissen Umständen führt die Bestrahlung von *Drosophila*-Männchen zu einem Überwiegen des männlichen Geschlechts in der Nachkommenschaft. Die erzielte Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses schrieb man zunächst einer unterschiedlichen Reaktionsnorm von X- und Y-führenden Keimzellen zu. Muller (1928b), Bauer (1939), Lea (1946), Catcheside (1948) und mit Einschränkungen auch Moriwaki et al. (1967) führen die Erscheinung zurück auf Genomschädigungen, die als dominante Letalfaktoren einen präimaginalen Tod bewirken. Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich hierbei um schwerwiegende Aneuploidien (Sonnenblick, 1940; Muller, 1954). Induzierte Genmutationen, die sich als dominant-letale Allele manifestieren, fallen im Lichte der Untersuchung von Lindsley et al. (1972) wohl kaum ins Gewicht. Da das Y-Chromosom ausser dem *bobbed*-Locus keine, das X-Chromosom aber rund 20%, der für ein Überleben essentiellen Information trägt (Safir, 1920; Stern, 1927; Hadorn, 1955), war man geneigt, den geschlechtsgekoppelten dominanten Letaleffekt den induzierten Aberrationen des X-Chromosoms zuzuschreiben, das Y-Chromosom aber lediglich als Partner in geschädigten Chromosomenkonfigurationen anzuerkennen, die im Prinzip aufgrund des autosomalen Ungleichgewichts letal wirken (Muller, 1928b; Hadorn, 1955). Solches könnte bis zu einem gewissen Grade für *D. hydei* und *D. pseudoobscura* (Morgan et al., 1930; Schultz, 1933) zutreffen, sind doch bei diesen Arten mittels extrem hoher Dosen Geschlechtsverhältnisse von 100♂/40♀ realisierbar. Nun haben aber in neuerer Zeit mehrere Autoren auch bei Anwendung ziemlich hoher Dosen die strahlenabhängige Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses bei *D. melanogaster* nicht beobachten können (Herskowitz et al. 1959; Leuthold, 1972; Lindsley et al., 1958); Moriwaki et al. (1967) finden eine statistische Signifikanz, nicht ausschliesslich, jedoch vorwiegend für Keimzellen, die als Meiosestadien bestrahlt wurden. Nebst der Beteiligung an unausgeglichene Chromosomenkonfigurationen kommt für das strahlengeschädigte X auch eine nicht in jedem Fall letal wirkende vollständige Elimination in Betracht, wodurch anstelle von XX-Weibchen männliche XO-Nachkommen überleben können. Es ist verschiedentlich belegt, dass solche Chromosomenverluste am ehesten durch Bestrahlung von Spermatocyten und wahrscheinlich auch von jungen Spermatiden erzielt werden (Fahmy et al., 1964; Sävhaugen, 1963; Suter, 1972). Bei *D. melanogaster* dürften Beobachtungen von Verschiebungen im Geschlechtsverhältnis in den meisten Fällen auf diese Ursache zurückgehen. Für Spermien erscheint bei dieser Art die Induzierbarkeit dominanter Letalität direkt korreliert mit Zahl und Grösse der bestrahlten Chromosomen, wobei für X- und Y-Chromosom annähernd gleiches gilt, ungeachtet der Unterschiede in Chromatin-Qualität und genetischer Information (Leuthold, 1972). Entsprechend könn-

te bei *D. hydei* der Grössenunterschied zwischen X- und Y-Chromosom Grund genug sein, um eine strahleninduzierte Verschiebung im Geschlechtsverhältnis hervortreten zu lassen. Mengenmässig erscheinen die heterochromatischen Komponenten des X-Chromosoms dem Chromatin des ganzen Y-Chromosoms ziemlich ebenbürtig, so dass der aus dem Geschlechtsverhältnis abgeleitete dominante Letaleffekt sich exklusiv auf den euchromatischen Anteil des X-Chromosoms beziehen lässt.

Aus einem Vergleich der Fig. 5 und 6 ergibt sich, dass in submaturen Spermien und fortgeschrittenen Spermatiden der geschlechtsgekoppelte dominante Letalschaden etwa doppelt so häufig induziert wird als rezessive Letalfaktoren. Quantitativ Genauerer lässt sich kaum feststellen, da das beobachtete Phänomen gegenüber Variationen der Aufzuchtverhältnisse recht empfindlich ist (vgl. Hannah-Alava, 1968). Zudem ist zur Darstellung des dominanten Letaleffekts (Fig. 5) eine rechnerische Approximation verwendet worden, die auf einfachsten Modellvorstellungen beruht. Auf die Finesse mechanistisch interpretierender Kalkulationen (vgl. Catcheside, 1948) ist verzichtet worden, stützen sich doch diese Formulierungen auf eine Aufarbeitung heterogenen Datenmaterials, die heute nicht mehr allgemein akzeptabel ist (Leuthold, 1972). Ausserdem fehlen für *D. hydei* gültige Schätzungen von Zwischenparametern.

Einem Vorschlag von Hadorn (1955) folgend, ist für *D. hydei* stichprobenmässig überprüft worden, ob die Kreuzung bestrahlter Männchen mit attached-X-Weibchen (Barth, 1929) zu einer erwartungsgemässen Verminderung der männlichen Nachkommenschaft führt. Nach Fig. 6 erwarten wir bei Bestrahlung mit 4500 rad γ -Strahlung, die wir annäherungsweise dem Effekt von 4500 R Röntgenstrahlung gleichsetzen, etwa 10% rezessiv-letal und nach unserer Vermutung ungefähr 20% dominant-letal geschädigte X-Chromosomen. Auf 100 weibliche Nachkommen sollten 72 männliche überleben. Die Stichprobe von 17000 Nachkommen, Bruten vom 2. bis 7. Tag nach Bestrahlung umfassend, ergab in guter Übereinstimmung ein ♀:♂-Verhältnis von 100:76 (unveröffentlicht). Chromosomenverlust ist bei diesem Ansatz ohne Einfluss auf das Geschlechtsverhältnis der überlebenden Brut, da bei *D. hydei* sowohl $\bar{X}\bar{X}O$ als auch YO letale Konfigurationen sind (H. Beck, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassung

Die Gattung *Drosophila* umfasst eine Grosszahl von Arten, die im Laufe der Evolution interspezifische Unterschiede auf manchem Niveau der genetischen Organisation ausgebildet haben. Die Literatur belegt Abweichungen im Chromosomensatz, der Genanordnung und auch in der Länge von Rekombinationskarten entsprechender Chromosomenenelemente. Ziel dieser Untersuchung

war es, *Drosophila hydei* mutationsgenetisch zu untersuchen, um durch einen Vergleich mit *Drosophila melanogaster* sowie andern Arten Aufschluss zu erhalten über die Bedeutung der genetischen Organisationsform bei experimentellen Eingriffen in das Erbgut.

Für *D. hydei* wurde eine Brutmuster-Methode ausgearbeitet, mit welcher die mutationsauslösende Wirkung von Röntgenstrahlen auf die verschiedenen Stadien der Spermatogenese verfolgt werden konnte. Es wurde deutlich, dass die Entwicklung der männlichen Keimzellen von *D. hydei* nur halb so rasch fortschreitet wie bei *D. melanogaster*. Die einzelnen Phasen dauern proportional länger. Erkennbar wurden sie durch Brutmuster-Eigenschaften, die sich weitgehend mit jenen bei *D. melanogaster* decken.

Es wird eine Methode zur Erfassung geschlechtsgekoppelter rezessiver Letalfaktoren bei *D. hydei* vorgestellt. Sie ermöglichte die Bestimmung der Häufigkeit, mit der solche Mutationen durch Bestrahlung ausgelöst werden. Für submature Spermien und fortgeschrittene Spermatiden wurde eine durchschnittliche Mutationsrate von $2,3 \cdot 10^{-2}/1000$ R ermittelt. Der berücksichtigte Dosisbereich war breit gewählt, zwischen 1,5 und 12 kR. Im Bezug auf die Erzeugung rezessiver Letalfaktoren besteht zwischen *D. melanogaster* und *D. hydei* kaum ein Unterschied. Die Mutationsraten von *D. funebris* und *D. subobscura* halten sich vermutlich in demselben Rahmen.

D. hydei und *D. melanogaster* unterscheiden sich in der Architektur ihrer Geschlechtschromosomen. Diesem Umstand wird es zugeschrieben, dass zwei Mutationsphänomene bei *D. hydei* deutlich hervortraten. (1) Nach Bestrahlung von Männchen wurde eine dosisabhängige Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses in der F_1 beobachtet. Aller Wahrscheinlichkeit nach beruht diese Erscheinung auf der Erzeugung geschlechtsgekoppelter, dominant-letalere Mutationsformen in den Zellen der Spermiogenese. Es wurde geschätzt, dass der dominante Letaleffekt rund doppelt so häufig in Erscheinung tritt als rezessive Letalfaktoren. (2) Junge Spermatogenesestadien zeigten sich besonders empfindlich für die Induktion von *bobbed*-Defizienzen. Der Schluss lag nahe, dass in diesem Falle die Region des Nucleolus-Organisators vom X-Chromosom abgetrennt wird und in der Folge verlorenggeht.

Dank

Herrn Professor Dr. H.J. Gloor danke ich für das interessante Thema und für die umsichtige Leitung dieser Untersuchung. Herr Dr. H.R. Kobel leistete wichtige Vorarbeit. Ihm und Herrn H. Beck bin ich für zahlreiche Hinweise und für die Mitteilung unveröffentlichter Ergebnisse dankbar, Herrn Dr. F.M.A. Van Breugel (Leiden) für die cytologischen Beiträge.

Die Arbeit wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Kredit Nr. 3.224.69).

Literatur

- AUERBACH C.: Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of X-rays. Z. Induktive Abstamm.- u. Vererbungslehre 86, 113–125 (1954).
- BARTH L. G.: The effect of X-rays on the spermatozoa of *Drosophila*. Physiol. Zool. 2, 172–180 (1929).
- BATEMAN A. J.: Mutagenic sensitivity of maturing *Drosophila* sperm. J. Genet. 54, 400–410 (1956).
- BAUER H.: Die Dosisabhängigkeit röntgeninduzierter Chromosomenmutationen im Ring-X-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Naturwissenschaften 27, 821–822 (1939).
- BERENDES H. D.: The salivary gland chromosomes of *Drosophila hydei* Sturtevant. Chromosoma 14, 195–206 (1963).
- BREUGEL F. M. A. VAN: An analysis of *white-mottled* mutants in *Drosophila hydei*, with observations on X–Y exchanges in the male. Genetica 41, 589–625 (1970).
- BREUGEL F. M. A. VAN: The action of the *Notch* locus in *Drosophila hydei*. Genetica 42, 25–41 (1971).
- BREUGEL F. M. A. VAN, RAY A. and GLOOR H.: A comparison of banding patterns in salivary gland chromosomes of two species of *Drosophila*. Genetica 39, 165–192 (1968).
- BUZZATI-TRAVERSO A. A. and SCOSSIROLI R. E.: The "Obscura Group" of the genus *Drosophila*. Adv. Genet. 7, 47–92 (1955).
- CATCHESIDE D. G.: Genetic effects of radiations. Adv. Genet. 2, 271–358 (1948).
- CHANDLEY A. C. and BATEMAN A. J.: Timing of spermatogenesis of *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. Nature 193, 299–300 (1962).
- CHINO M.: Genetics of *Drosophila virilis* (japanisch). Jap. J. Genet. 12, 257–277 (1936).
- CHRISTIE A. L. M.: The effect of X-rays on sex in *Drosophila subobscura* and an account of some sex-linked characters. J. Genet. 39, 47–60 (1939).
- COOPER K. W.: Cytogenetic analysis of major heterochromatic elements (especially XH and Y) in *Drosophila melanogaster*, and the theory of heterochromatin. Chromosoma 10, 535–588 (1959).
- FAHMY O. G. and FAHMY M. J.: Radiosensitivity of the stages of spermatogenesis to different mutations in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 1, 247–267 (1964).
- FIALA Y. and NEUBERT J.: Die Erzeugung von Chromosomendislokationen durch Röntgenstrahlen in der Keimbahn und in den Geschlechtszellen verschiedenen Alters bei *Drosophila hydei* Sturt. Chromosoma 4, 577–584 (1952).
- FREI H.: Röntgeninduktion geschlechtsgekoppelter rezessiver Letalfaktoren und Mutationsrate bei *Drosophila hydei* (Abstract). Archiv für Genetik 45, 99–100 (1972).
- FRITZ-NIGGLI H.: Strahlenbiologie, Grundlagen und Ergebnisse. Georg Thieme-Verlag Stuttgart 1959.
- FRITZ-NIGGLI H.: Meiose und Spermatidenbildung in unbestrahlten und bestrahlten männlichen Keimzellen von *D. melanogaster*. Revue Suisse Zool. 79 (Suppl., Festschrift E. Hadorn), 245–265 (1972).
- HADORN E.: Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Georg Thieme-Verlag Stuttgart 1955.
- HANNAH-ALAVA A.: The premeiotic stages of spermatogenesis. Adv. Genet. 13, 157–226 (1965).
- HANNAH-ALAVA A.: Sex-ratio depression as a brood-pattern criterion of radiation damage in *Drosophila melanogaster*. Genetica 39, 519–543 (1968).
- HARRIS B. B.: The effects of ageing of X-rayed males upon mutation frequency in *Drosophila*. J. Heredity 20, 299–302 (1929).
- HAUSCHTECK-JUNGEN E., JUNGEN H. und MÜLLER M.: Karyotyp und Meiose bei wild- und sex ratio-Männchen von *Drosophila subobscura*. Revue Suisse Zool. 79 (Suppl., Festschrift E. Hadorn), 297–305 (1972).
- HENNIG W.: Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Lampenbürsten-Y-Chromosoms in der Spermatogenese von *Drosophila*. Chromosoma 22, 294–357 (1967).

- HERSKOWITZ I.H. and BAUMILLER R.C.: Phenotypic effects of heterozygous, X-ray-induced mutations in *Drosophila*. *Science* 130, 162–163 (1959).
- HESS O. and Green M.M.: *Drosophila* species: new mutants, *D. hydei*. *Drosophila Information Service* 40, 37–39 (1965).
- KAPLAN W.D. and SIKEN J.E.: Genetic and autoradiographic studies of tritiated thymidine in testes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 16, 67–69 (1960).
- KAPLAN W.D., GUGLER H.D., KIDD K.K. and TINDERHOLT V.E.: Nonrandom distribution of lethals induced by tritiated thymidine in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 49, 701–714 (1964).
- KAUFMANN B.P. and GAY H.: Cytological evaluation of differential radio-sensitivity in spermatogenous cells of *Drosophila*. In: SOBELS F.H.: Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells, p. 375–408. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris 1963.
- KELLER C. und LÜERS H.: Röntgenstrahlendosis und Mutationsrate bei *Drosophila funebris*. *Biol. Zentralblatt* 57, 288–292 (1937).
- KISHIN A.F.E.: The response of the immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays. *Z. Induktive Abstamm.- u. Vererbungs.* 87, 97–112 (1955).
- KOBEL H.R. and GLOOR H.: *Drosophila* species: new mutants, *D. hydei*. Report of H. Gloor. *Drosophila Information Service* 47, 47–52 (1971).
- LEA D.E.: Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press Cambridge 1946.
- LEFEVRE G. Jr. and JONSSON U.-B.: X-ray induced mutability in male germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 1, 231–246 (1964a).
- LEFEVRE G. Jr. and JONSSON U.-B.: The effect of mating intensity on mutation frequency patterns detected after irradiation of *Drosophila melanogaster* males. *Genetics* 50, 879–890 (1964b).
- LEIGH B.: Radiation-induced loss of ring-X chromosomes in the germ cells of *Drosophila melanogaster* males. *Mutation Res.* 8, 101–109 (1969).
- LEIGH B. and SOBELS F.H.: Induction by X-rays of isochromosomes in the germ cells of *Drosophila melanogaster* males. *Mutation Res.* 10, 475–487 (1970).
- LEUTHOLD U.: Einfluss der Geschlechtschromosomen auf die Strahlenempfindlichkeit verschiedener Zelltypen von *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 14, 65–81 (1972).
- LINDSLEY D.L., EDINGTON C.W. and VON HALLE E.S.: The relation of the genetic constitution of *Drosophila* spermatozoa to their sensitivity to X-radiation. *Radiation Res.* 8, 145 (1958).
- LINDSLEY D.L., SANDLER L., BAKER B.S., CARPENTER A.T.C., DENELL R.E., HALL J.C., JACOBS P.A., MIKLOS G.L.G., DAVIS B.K., GETHMANN R.C., HARDY R.W., HESSLER A., MILLER S.M., NOZAWA H., PARRY D.M. and GOULD-SOMERO M.: Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. *Genetics* 71, 157–184 (1972).
- LÜNING K.G.: X-ray induced dominant lethals in different stages of spermatogenesis in *Drosophila*. *Hereditas* 38, 91–107 (1952).
- MARTIN A.: Studies on the rate of spermatogenesis in *Drosophila*. Effects of X-rays and streptonigrin. *Z. Vererbungs.* 96, 28–35 (1965).
- MAYNARD SMITH J.: Fertility, mating behaviour, and sexual selection in *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* 54, 261–279 (1956).
- METZ C.W.: Observations on spermatogenesis in *Drosophila*. *Z. Zellforsch. mikroskop. Anatomie* 4, 1–28 (1926).
- METZ C.W. and MOSES M.S.: Chromosomes of *Drosophila*. Chromosome relationships and genetic behavior in the genus *Drosophila*: I. A comparison of the chromosomes of different species of *Drosophila*. *J. Heredity* 14, 195–204 (1923).
- MEYER G.F. and HENNIG W.: The nucleolus in primary spermatocytes of *Drosophila hydei*. *Chromosoma* 46, 121–144 (1974).
- MORGAN T.H., BRIDGES C.B. and SCHULTZ J.: The constitution of the germinal material in relation to heredity. *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 29, 352–359 (1930).

- MORIWAKI D., TOBARI I., OHBA S., KITAGAWA O., TOBARI Y.N. and IKEDA H.: A shift of sex-ratio in the progeny from irradiated males in *Drosophila melanogaster*. Jap. J. Genet. 42, 23-38 (1967).
- MOSSIGE J.C.: Sperm utilization and brood patterns in *Drosophila melanogaster*. Amer. Natur. 89, 123-127 (1955).
- MULLER H.J.: The measurement of gene mutation rate in *Drosophila*, its high variability and its dependence on temperature. Genetics 13, 279-357 (1928a).
- MULLER H.J.: The problem of genic modification. Verh. V. Int. Kongr. Vererbungswissenschaft. In: Z. Induktive Abstamm.- u. Vererbungslehre, Suppl. 1, 234-260 (1928b).
- MULLER H.J.: The nature of the genetic effects produced by radiation. In: HOLLAENDER A.: Radiation biology, Vol. I part 1, p.351-373. McGraw-Hill New York 1954.
- MULLER H.J., HERSKOWITZ I.H., ABRAHAMSON S. and OSTER I.I.: A nonlinear relation between X-ray dose and recovered lethal mutations in *Drosophila*. Genetics 39, 741-749 (1954).
- OLIVIERI G. and OLIVIERI A.: Evidence for the two-hit nature of X-ray induced crossing-over in the centromeric region of *Drosophila* males. Mutation Res. 1, 279-295 (1964).
- OLIVIERI G. and OLIVIERI A.: Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 2, 366-380 (1965).
- PERJE A.M.: Genetic and cytological studies of *Drosophila funebris*, some sex-linked mutations and their standard order. Acta. Zool. 36, 51-66 (1955).
- PURO J.: Temporal distribution of X-ray induced recessive lethals and recombinants in the poststerile broods of *Drosophila melanogaster* males. Mutation Res. 1, 268-278 (1964).
- RITOSSA F.M., ATWOOD K.C. and SPIEGELMAN S.: A molecular explanation of the *bobbed* mutants of *Drosophila* as partial deficiencies of "ribosomal" DNA. Genetics 54, 819-834 (1966).
- SAFIR S.R.: Genetic and cytological examination of the phenomenon of primary nondisjunction in *Drosophila melanogaster*. Genetics 5, 459-487 (1920).
- SÄVHAGEN R.: Cell stages and differential sensitivity to irradiation in males of *Drosophila melanogaster*. In: SOBELS F.H.: Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells, p.343-353. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris 1963.
- SCHULTZ J.: X-ray effects on *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 18, 284-291 (1933).
- SNEDECOR G.W. and COCHRAN W.G.: Statistical methods, 6th ed. Iowa State University Press Ames Iowa 1967.
- SOBELS F.H.: Repair and differential radiosensitivity in developing germ cells of *Drosophila* males. In: SOBELS F.H.: Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells, p.179-197. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris 1963.
- SOBELS F.H.: The role of oxygen in determining initial radiosensitivity and post-irradiation recovery in the successive stages of *Drosophila* spermatogenesis. Mutation Res. 2, 168-191 (1965a).
- SOBELS F.H.: Radiosensitivity and repair in different germ cell stages of *Drosophila*. In: GEERTS S.J.: Genetics today. Proc. XI. Int. Congr. Genet., The Hague, The Netherlands, p.235-255. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris 1965b.
- SOBELS F.H.: The role of *Drosophila* in the field of mutation research. Archiv für Genetik 45, 101-125 (1972).
- SONNENBLICK B.P.: Cytology and development of the embryos of X-rayed adult *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 26, 373-381 (1940).
- SPENCER W.P.: Gene homologies and the mutants of *Drosophila hydei*. In: JEPSEN G.L., MAYR E. and SIMPSON G.G.: Genetics, paleontology and evolution, p.23-44. Princeton University Press Princeton N.J. 1949.
- SPENCER W.P.: Genetic studies on *Drosophila mulleri*. II. Linkage maps of the X and chromosome II with special reference to gene and chromosome homologies. Univ. Texas Publ. 5721, 206-217 (1957).

- SPENCER W.P. and STERN C.: Experiments to test the validity of the linear r-dose/mutation frequency relation in *Drosophila* at low dosage. *Genetics* 33, 43–74 (1948).
- SPURWAY H.: The genetics and cytology of *Drosophila subobscura*. I. Element A. Sex linked mutants and their standard order. *J. Genet.* 46, 268–286 (1945).
- STERN C.: Ein genetischer und cytologischer Beweis für Vererbung im Y-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. *Z. Induktive Abstamm.- u. Vererbungslehre* 44, 187–231 (1927).
- STUBBE H.: Genmutation. I. Allgemeiner Teil. In: BAUR E. und HARTMANN M.: Handbuch der Vererbungswissenschaft, Lieferung 23 (II, F). Verlag Gebrüder Bornträger Berlin 1938.
- SUTER K.: Röntgeninduzierte Mutationsspektren verschiedener Keimzellstadien von *Drosophila*-Männchen mit einem doppelt markierten Y-Chromosom und einem Stab-X- oder Ring-X-Chromosom. *Mutation Res.* 19, 83–98 (1973).
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY N. W.: Zur Frage der Beziehungen zwischen strahlenausgelösten Punkt- und Chromosomenmutationen bei *Drosophila*. *Chromosoma* 1, 310–316 (1939).
- TRAUT H.: Dose dependency of the frequency of radiation-induced recessive sex-linked lethals in *Drosophila melanogaster*, with special consideration of the stage sensitivity of the irradiated germ cells. In: SOBELS F. H.: Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells, p. 359–374. Pergamon Press Oxford-London-New York-Paris 1963.
- TRAUT H.: The dose-dependence of X-chromosome loss and nondisjunction induced by X-rays in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 1, 157–162 (1964).

Intragenic Recombination at the *white* Locus of *Drosophila hydei*

Hansjörg Frei

Laboratoire de Génétique animale et végétale, Université de Genève,
154, route de Malagnou, CH-1224 Chêne-Bougeries/Genève, Switzerland

Received July 27, 1975

Summary. A fine-structure analysis of the *white* locus in *Drosophila hydei* was carried out by means of allele recombination. Four mutants, derived from wild type, mapped at three subloci. These are possibly homologous to the main subloci 2, 3, and 4 of *D. melanogaster*. Three secondary mutants, derived from the primary w^{iv} allele, were located in the proximal part of the gene. One of them appeared as a homoallele of the original w^{iv} , whereas the remaining two are better explained either as double mutants or as mutants which facilitate irregular exchange.

Intragenic recombination at the *white* locus seems to be more frequent in *D. hydei* than in *D. melanogaster*. The comparatively high incidence is probably a general characteristic, common to intragenic and intergenic recombination in *D. hydei*.

Introduction

To compare the genetic organization of different *Drosophila* species, Spencer (1949, 1957), Wasserman (1954, 1962a, b), and van Breugel, Ray and Gloor (1968) studied the chromosomes of *D. melanogaster*, *D. hydei* and *D. mulleri*. *D. melanogaster*, of the subgenus *Sophophora*, is a distant relative of the other two species, both of which belong to the subgenus *Drosophila* (cf. Throckmorton, 1962). *D. hydei* and *D. mulleri* in their turn are distinguished as the type species of two separate subgroups in the *repleta* species group. The results of the chromosome comparisons of the three species can be summarized as follows: (i) The X chromosomes of the species are homologous, in that their linkage groups contain corresponding genetic information. (ii) The sequence of homologous gene loci on the X chromosome may be similar, i.e., there may be a concordant array, as shown by the genetic maps and by the banding patterns in the polytene X chromosomes of *D. hydei* and *D. mulleri*. On the other hand, the banding patterns in the polytene chromosomes of *D. melanogaster* and *D. hydei* are in no way superimposable. The genetic maps, too, argue for a divergence by evolution of the gene order on the X chromosomes of these two species. (iii) Genetic mapping indicated differences between all the three species in the total length of the X chromosome, measuring 70 Morgan units in *D. melanogaster*, roughly the double in *D. hydei*, and nearly three times as much in *D. mulleri*.

One may infer that it is the general incidence of recombination between genes which is different in the species mentioned, because the available data make it improbable that unequal map length is caused by differences in the number of genes contained in the chromosomes (Frei, 1974), or by variations in the arrangement of the genes on the chromosomes (Spencer, 1957). If this holds for the chro-

mosome as a whole, one may ask the question whether the striking differences in total length are characteristic of recombination between genes only, or whether they also reflect similar differences at the level of intragenic recombination. Abundant information about recombination within a single gene has been compiled for the *white* locus of *D. melanogaster* (Carlson, 1959; Green, 1959a; Judd, 1959, 1964; Lindsley and Grell, 1968), but nothing was known concerning the other two species. In *D. hydei*, I had at my disposal a series of seven alleles of the *white* locus. The material appeared sufficient to attempt a probe into the organization as well as the frequency and mode of recombination in that gene locus.

Material and Methods

Four mutant alleles of the *white* locus (loc. 1-19.0, Spencer, 1949) arose from wild type. Phenotypically they show three different degrees of reduced eye pigmentation. Three alleles producing darker phenotypes were found in attached-X chromosomes as derivatives of a *white* allele with an off-white phenotype. The description of the phenotypes and the allele designation must not be taken as an allusion to allele homology with respect to similarly named *white* alleles in *D. melanogaster*.

(a) w^{sw1} : *white-sneeuw-1*. Discoverer: Holleman 67f. Reference: Van Breugel (1970), listed as w^{sw} . Spontaneous origin. Phenotype: Eyes pure white, chromatographs of head extracts show traces only of fluorescent pterins (unpublished).

(b) w^{sw2} : *white-sneeuw-2*. New mutant, discovered 1972 as one mutant male among the offspring of gamma-irradiated wild type males and attached-X females. Phenotype and chromatographs of head extracts are similar to those of w^{sw1} (unpublished).

(c) w^{iv} : *white-ivoor*. Although unequivocal documentation is lacking, the allele is most probably identical with the first *white* allele, found in a natural population and described by Clausen (1923). Synonym: *w*. Reference: Van Breugel (1970). Phenotype: At 25° C, eyes slightly ivory tinged; at 18° C, yellowish eyes in young, pink eyes in aged flies; heads contain fluorescent pterins in reduced amount (Frei, 1973). Van Breugel (1970) describes another allele, *white-roze*. The report must be erroneous, as it was found in this laboratory (unpublished) that the *white-roze* phenotype results from an interaction of w^{iv} with another mutant gene (loc. 1-50), about 30 units apart from the *white* locus.

(d) w^{ak} : *white-abrikoos*. Discoverer: Hess 65 e. X-ray induced. Synonym: w^a (*white-apricot*). Reference: Van Breugel (1970). Phenotype: Eyes of pale apricot colour; although this is not the allele with the darkest eye colour phenotype, w^{ak} flies show the largest amount of extractable fluorescent pterins in their heads among all the mutant types so far studied (Frei, 1973). An interaction phenotype of ivory tinged eye colour results from the combinations of w^{ak} with *tomato-F2* and *garnet-F1*, both new mutants.

(e) w^{ml} : *white-melon*. New mutant, derivative of w^{iv} . Discoverer: Gloor 1969. Identified in a single female with attached-X chromosomes, heterozygous $w^{iv} \cdot w^{ml}$. Occurred spontaneously in an attached-X stock of the constitution $C(1)RM, w^{iv} y^{Lt}$ (Gregg, 1957). Phenotype: Eyes of amber colour, somewhat lighter than in w^{hg} and w^{fr} mutant types; chromatographs of head extracts similar to those of w^{fr} (unpublished). Cytology normal (F. van Breugel, personal communication). Synonym w^{al} (Frei, 1973).

(f) w^{hg} : *white-honing*. Mutational derivative of w^{iv} . Discoverer: Van Breugel, 1969. Occurred spontaneously in an attached-X stock of the constitution $C(1)RM, w^{iv} y^{Lt}$. Identified in a single homozygous female $w^{hg} \cdot w^{hg}$. Reference: Van Breugel (1970). Phenotype: Eyes of amber colour; chromatographs of head extracts are similar to those of w^{fr} (unpublished).

(g) w^{fr} : *white-fraise*. New mutant, derivative of w^{iv} . Discovered in 1969 as a single female with attached-X chromosomes, heterozygous $w^{iv} \cdot w^{fr}$; occurred among the offspring of X-rayed attached-X females, $C(1)RM, w^{iv} y^{Lt}$, and *v sc sn* males. Phenotype: Eyes of amber

1 (a, b), *sneeuw*; (c), *ivoor*; (d), *abrikoos*; (f), *honing*; (g), *fraise* = Dutch or French for snow, ivory, apricot, honey, and raspberry, respectively.

colour, similar to w^{hg} ; chromatographs of head extracts revealed the presence of fluorescent pterins in amounts intermediate between w^{iv} and w^{ak} (Frei, 1973). Cytology normal (F. van Breugel, personal communication).

Ordinary, non-selective cross methods were used to establish a map of the *white* locus. At present, no effect of chromosome interaction is known in *D. hydei* that would enhance the frequency of recombination between sex-linked genes. To determine the relative map positions of the mutant sites, it was required to introduce recessive flanking markers of the nearest loci known to either side of *white*, i.e., *scute* (loc. 1-15.6) and *singed* (loc. 1-31.4). The distinguishable alleles *yellow* (loc. 1-38.8) and *yellow-Light* proved useful as additional markers. A *Notch* mutant (loc. 1-22.4) and the mutation *spreadex-67d* (preliminary location: 1-63±) were each used on one occasion. A control cross with homozygous w^{iv} females involved the mutation at position 1-50, which interacts with w^{iv} [cf. (c) above]; definitive nomenclature is not yet established, hence its provisional designation "roze" ("rz") in this report. More detailed information about the marker genes has been presented by Spencer (1949) and Kobel and Gloor (1971).

The *white* alleles w^{ml} , w^{hg} and w^{fr} arose on attached-X chromosomes. Detachments were produced by means of X-rays more than one year before the present study was started. Since, w^{fr} and w^{hg} were kept in homozygous stocks; w^{ml} was maintained on attached-X chromosomes in the female, and on detached chromosomes in the male line of the same stock. Considering that in *D. hydei* the attached-X chromosomes and the resulting detached chromosomes are not yet well studied with respect to their segregational properties, the possibility could not be ruled out that on certain occasions some non-disjunction might occur, and then possibly interfere with the record of offspring that resulted from intragenic recombination. In such crosses, the female parent was free of the *singed* marker. XO male offspring of non-disjunctive origin was recognized from the manifestation of *singed*, transmitted in the combination $sc w^{iv} sn y$ by the male parent.

Results

Basic information on intragenic recombination at the *white* locus was obtained from a first set of crosses comprising four alleles, w^{sw1} , w^{sw2} , w^{iv} , and w^{ak} (Table 1). Arisen from wild type, these alleles represent mutations in a conventional sense. Compound females with different pairs of alleles were crossed to *white* mutant males. Among the offspring, rare *white*⁺ exceptions were recovered in four crosses, indicating that the alleles constitute a pseudo-allelic series. In the total score of 39 exceptions, 38 exhibited a recombined situation for the flanking markers, *scute* and *singed*. With one exception only, the exchange events at the *white* locus were thus associated with intergenic crossing over. All the *white*⁺ recombinants in each particular cross showed the same direction of marker exchange. Hence, unambiguous mapping within the gene and in relation to the flanking loci proved possible. The three alleles, w^{sw1} , w^{sw2} , and w^{ak} , mapped distally to the fourth, w^{iv} . Among the distal alleles, w^{sw2} and w^{ak} were found to occupy different positions on the gene, though apparently, they are intimately linked. The sequence on the map, from proximal to distal, appeared as $w^{iv} - w^{sw2} - w^{ak}$. Two attempts to obtain recombination between w^{ak} and w^{sw1} gave negative results. Accordingly, the two alleles must be placed at an identical site, or nearly so.

Intragenic exchange was recognized in these crosses from the occurrence of recombinant *white*⁺ progeny. Most probably, the reciprocal exchange products were formed too, but went undetected as they supposedly were double mutants producing a white eye phenotype similar to that of parental mutants. It seemed appropriate therefore, to correct for this informational loss by taking twice the frequency of *white*⁺ exceptions as the most likely estimate of the map distance that separates the hetero-alleles. Three somewhat different, but statistically compatible

Table 1. Recombination between four different mutant alleles of the *white* locus, derived from wild type

Cross $\text{♀} \times \text{♂}$	Recombinants			Total progeny	Frequency of recombinants $[p \pm (pq/N)^{1/2}] \times 10^4$	Approximate map distance in Morgan units	
	sc	w	sn y				
(1) $\frac{+}{sc} \frac{w^{iv}}{w^{ak}} \frac{sn}{+} \frac{y}{+}$	17	+	+	88,564	1.9 ± 0.5	$w^{ak} \dots w^{iv}$	$\left. \begin{matrix} 5/100(a) \\ 4/100 \end{matrix} \right\}$
(2) $\frac{sc}{+} \frac{w^{iv}}{w^{sw1}} \frac{sn}{+} \frac{y}{+}$	11	sc	+	41,563	3.1 ± 0.9	$w^{sw1} \dots w^{iv}$	$\left. \begin{matrix} 5/100(a) \\ 6/100 \end{matrix} \right\}$
(3) $\frac{sc}{+} \frac{w^{iv}}{w^{sw2}} \frac{sn}{+} \frac{y}{+}$	7	sc	+	35,771	2.0 ± 0.8	$w^{sw2} \dots w^{iv}$	$\left. \begin{matrix} 5/100(a) \\ 4/100 \end{matrix} \right\}$
(4) $\frac{sc}{+} \frac{w^{ak}}{w^{sw2}} \frac{sn}{+} \frac{y^*}{+}$	1	+	sn	41,317	0.5 ± 0.4	$w^{ak} \dots w^{sw2}$	$\left. \begin{matrix} 5/100(a) \\ 5/100(s) \\ 1/100 \end{matrix} \right\}$
(5) $\frac{sc}{+} \frac{w^{ak}}{w^{sw1}} \frac{sn}{+} \frac{y}{+}$			none	73,348	0		
(6) $\frac{sc}{+} \frac{w^{ak}}{w^{sw1}} \frac{sn}{ND1} \frac{y}{+}$			none	53,853	0		
(7) $\frac{sc}{+} \frac{w^{iv}}{w^{iv}} \frac{sn}{+} \frac{y}{+} \frac{+}{r_2^{''}}$			none	$36,600 \pm$	0		

* Crossed to $\text{♂} \frac{+}{sc} \frac{w^{ak}}{w^{ak}} \frac{sn}{sn} \frac{y}{y}$; (a) average; (s) sum.

values were obtained for the map distance between the most distant positions, i.e., between w^{iv} on one side and w^{ak} and w^{sw1} on the other side. From these figures (cf. Table 1), it becomes apparent that the map length of the *white* locus in *D. hydei* evaluates as 1/20 of a Morgan unit, at its minimum.

Among the progeny of w^{sw2}/w^{ak} females (cross nr. 4) only two *white*⁺ exceptions showed up. One of them was not a recombinant type with respect to the markers, and furthermore, exhibited a non-mutant phenotype for all the genes, *white* and the markers. Thus, its possible origin from contamination was not beyond suspicion. As it happened, it was a female, so that the recessive genes on each X chromosome could be uncovered by a further cross. An origin from contamination thereby appeared as a rather improbable explanation, because it was found that one of the X chromosomes was *sc w^{iv} sn y*, i.e., corresponded to the marking of the male parent in the preceding cross. Hence, the other X chromosome, actually *sc⁺ w⁺ sn⁺ y⁺*, represented the maternal contribution to the pair of X chromosomes, and so far appears as the only case where a change to wild type at the *white* locus was not in parallel with recombination of the nearest flanking markers.

Further tests concerned the three *white* alleles, w^{ml} , w^{hg} , and w^{fr} , which had been derived from the w^{iv} allele on the attached-X chromosome of Gregg (Gregg, 1957). They were found independently as secondary mutations producing an orange-brown eye colour instead of the ivory tinge of the primary mutant. Such mutations seem to occur at a low rate. In a control cross (7) with homozygous w^{iv} females, no partial or full revertant of w^{iv} was found among 36,000 offspring. Moreover, the introduction of the recessive modifier "*roze*", which slightly enhances the pigment production in w^{iv} mutant types, did not result in the recovery of any new, more strongly coloured *white* mutant phenotype among the 9,000 male offspring that could have shown it.

On test-crossing the three incidentally obtained derivative mutants of w^{iv} , it was found that they all mapped proximally to w^{ak} , like the original w^{iv} mutation. This is proved by the marker combination of the *white*⁺ recombinants (R1) found in the appropriate crosses (Table 2). In addition to these recombinants, reciprocal types (R2) showed up as exceptions with a white eye phenotype. A third class of exceptional offspring (E) was present in the progenies of w^{ak}/w^{hg} and w^{ak}/w^{fr} females, but not in that of w^{ak}/w^{ml} females. Such individuals exhibited a white eye phenotype, as did the R2 types, but the marker situation corresponded to that found in *white*⁺ recombinants. A minority of white eyed exceptions presented a parental marker combination, probably as a consequence of an additional crossing over in the *white-yellow* interval. In Table 2, they were classified (as R2 or E types) according to the marker of tighter linkage, i.e., *scute*. E-type recombinants with white eyes and correspondingly recombined markers were also obtained from heterozygous females w^{hg}/w^{+} and w^{fr}/w^{+} , but again no such exception was found among the offspring of w^{ml}/w^{+} females. Hence, the E-type exceptions occurred exclusively when w^{hg} or w^{fr} were concerned. The exceptions appeared at low frequency, in both sexes likewise, and essentially in connection with marker recombination. This concomitance indicates that E-type exceptions, too, are the products of intragenic exchange.

Considering the origin of the w^{ml} , w^{hg} , and w^{fr} mutants, it seems logical to assume a double mutant state for these derivatives of w^{iv} . Each of them would

Table 2. Intragenic exchange between three derivatives of w^{iv} (w^{hg} , w^{ml} , w^{fr}), and w^{ak} or w^+ . R1 = Marker combination of $white^+$ recombinants, R2 = Reciprocal types (see p. 109), E = Exceptional offspring

Cross $\text{♀} \times \text{♂}$ $sc\ w^{iv}\ sn\ y$	Recombinants			Total progeny
	R1	R2	E	
(8) $\frac{sc\ w^{ak}\ y}{+\ w^{hg}\ y^{Lt}}$	3 $w^+\ y$	10 $sc\ w\ y^{Lt}$ 3 $sc\ w\ y$	5 $w\ y$ 1 $w\ y^{Lt}$	38,210
(9) $\frac{sc\ +\ y}{+\ w^{hg}\ y^{Lt}}$	...	—	3 $w\ y$	15,387
(10) $\frac{sc\ w^{ak}\ y}{+\ w^{ml}\ y^{Lt}}$	11 $w^+\ y$	8 $sc\ w\ y^{Lt}$ 1 $sc\ w\ y$	—	37,721
(11) $\frac{+\ +\ sd\ x^{67d}}{w^{ml}\ y^{Lt}\ +}$	...	—	—	12,492
(12) $\frac{sc\ w^{ak}\ y}{+\ w^{fr}\ y^{Lt}}$	14 $w^+\ y$	4 $sc\ w\ y^{Lt}$	7 $w\ y$ 1 $w\ y^{Lt}$	40,508
(13) $\frac{sc\ +\ y}{+\ w^{fr}\ y^{Lt}}$	...	—	2 $w\ y$	18,856

(...) No exception expected.
(-) No exceptional type recovered.

thus comprise a newly acquired mutant site in addition to the original w^{iv} mutation. The double nature seems confirmed by the finding that females, which were heterozygous w^{hg}/w^+ or w^{fr}/w^+ , produced white eyed offspring of recombinational origin. If the interpretation is correct, the experiments on recombination between w^{ak} and the w^{iv} derivatives would represent a trifactorial approach to the genetic fine structure of the *white* locus. It should be possible to assign map positions to the mutations of which the derivatives are composed. The progeny tests with females w^{ak}/w^{hg} and w^{ak}/w^{ml} conceivably met with the adopted hypothesis. Here, the intragenic exchanges were mainly associated with marker recombination, whereby the overall frequencies of the two reciprocal marker combinations showed suggestive equality. Since this indicates that no intragenic recombinant type has systematically escaped observation, a direct estimate of the map distance between the outermost mutant sites can be obtained from the summed frequencies of all the intragenic exchanges. This figure of maximum distance coincided in both of these cases considered, with a previously determined distance, i.e., that between w^{ak} and w^{iv} . Hence, the positions of the secondarily acquired mutant sites should fall into this interval.

With regard to the frequencies of $white^+$ and E-type recombinants with parallel direction of exchange, an intermediate location seems likely for the second site of w^{hg} as shown by Fig. 1. It can be deduced that the white eyed E-type recombinants contain a single mutant site, viz., the secondary mutation (w^{hgB}), separated from the primary w^{iv} mutation. The R2 types, which were as frequent in the pro-

Table 3. Intragenic exchange between a putative complex mutant, $w^{ak} w^{fr}$, and the alleles w^+ , w^{sw1} , and w^{iv}

Cross ♀ × ♂ <i>sc w^{iv} sn y</i>				Recombinants		Total progeny
(14)	<i>sc</i> +	<i>w^{ak} w^{fr}</i> +	<i>y^{Lt}</i> +	2	<i>sc w^{ak}</i>	3 <i>w^{fr} y^{Lt}</i> 25,090
(15)	<i>sc</i> +	<i>w^{ak} w^{fr}</i> <i>w^{sw1}</i>	<i>y^{Lt}</i> +	5	<i>sc w^{ak}</i>	37,570
(16)	<i>sc</i> +	<i>w^{ak}</i> <i>w^{iv} sn y</i>	<i>w^{fr} +</i> <i>y^{Lt}</i>	16	<i>w^{fr} y^{Lt}</i> <i>w^{fr} y</i>	26,566

geny of w^{ak}/w^{hg} females as the R1 and E types together, then probably form a bipartite class including two different mutant situations of the *white* gene. According to the adopted model, these would correspond to the $w^{ak} w^{iv}$ and the $w^{ak} w^{hg}$ combinations, both with a white eye phenotype.

No intragenic recombinants were identified among the offspring of w^{ml}/w^+ heterozygotes; compound females w^{ak}/w^{ml} produced only *white*⁺ recombinants and the reciprocal white eyed type, interpreted here as representing the double mutant $w^{ak} w^{ml}$. Hence, in contrast to the findings with w^{hg} , the results obtained from w^{ml} are explained more satisfactorily by the assumption that in this particular case the secondary change concerns the w^{iv} site itself or its very close neighbourhood.

Still different results were obtained with the third derivative, w^{fr} . Intragenic exchange in the compound w^{ak}/w^{fr} was mainly associated with marker recombination—as is commonly the case—but one direction of recombination registered with preponderance, including intralocus changes to wild type (R1) and to a white eyed type (E). These exceptions with parallel direction of exchange were so frequent that the derived estimate of the map distance between the most distant mutant sites ranges around 1/10 Morgan unit. This would imply that the secondary mutant site of w^{fr} and the site of w^{ak} are situated at opposite ends of the gene, with the site of w^{iv} in between. Since white eyed exceptions with the reciprocal marker combination were rare, it is conceivable that the score of reciprocals fell short of one of the expected recombinant types. Most likely, the recombinants reciprocal to the E types were not recovered. There was reason for such an assumption, because the analysis of an R2 type showed that this *white* gene contains w^{ak} and w^{fr} in a linked state, as ought to be the case in the reciprocal counterpart to the *white*⁺ recombinant type. Table 3 presents the relevant observations. The $w^{ak} w^{fr}$ -carrying chromosome in question came from a single male present among the offspring of w^{ak}/w^{fr} females. This chromosome was subsequently maintained in the male line of an attached-X stock for further use in three test crosses: In the progeny of $w^{ak} w^{fr}/w^+$ heterozygotes, both the phenotypes, w^{ak} and w^{fr} , were identified as the reciprocal products of intragenic recombination. Compounds containing the $w^{ak} w^{fr}$ gene over either a lefthand mutant (w^{sw1}) or a righthand mutant (w^{iv}) led to the recovery of only one of the two exchange products, viz., w^{ak} in the first case and w^{fr} in the second one. The reciprocal types, though probably formed,

could not be detected owing to an overlap with the white eye phenotype produced by the parental alleles. Essentially, a white eye phenotype is likely (i) or directly demonstrated (ii) for the following combinations in *cis*-arrangement: (i) $w^{sw1} w^{fr}$, $w^{ak} w^{iv}$; (ii) $w^{ak} w^{fr}$.

In none of the crosses did a deviating phenotype show up that might relate to the presence of the sole secondary mutation of w^{fr} , i.e., in a condition where it has become separated from the primary w^{iv} mutation. It seems that the w^{fr} phenotype depends specifically on the presence of both the mutations in the gene, whereby—in the course of intragenic recombination—the linked w^{iv} mutation may be replaced by another w^{iv} introduced from a partner chromosome. The indication for this is as follows: Considering the w^{fr} recombinants recovered from $w^{ak} w^{fr}/w^{iv}$ compound females, there are theoretically two ways how they could have arisen, namely by recombination to the left or to the right of w^{iv} :

$$\begin{array}{ccccc}
 w^{ak} & w^{frA} & & w^{frB} & \\
 \cdots & & & & \cdots \\
 & \times & & \times & \\
 \cdots & & & & \cdots \\
 + & w^{iv} & & + &
 \end{array}$$

An exchange ($\times$) to the left would link a normal left part with a double mutant right part, i.e., with the original w^{fr} (w^{frA} = primary mutant site, w^{frB} = secondary mutant site). An exchange to the right would combine the rightmost mutant part (w^{frB}) of the $w^{ak} w^{fr}$ gene with the normal left part and the w^{iv} middle section of the partner gene. One can assume that these two ways of exchange correspond to those that led to the *white*⁺ and E-type recombinants in the progeny test of w^{ak}/w^{fr} compound females:

$$\begin{array}{ccccc}
 + & w^{frA} & & w^{frB} & \\
 \cdots & & & & \cdots \\
 & \times & & \times & \\
 \cdots & & & & \cdots \\
 w^{ak} & + & & + &
 \end{array}$$

Common to both compounds was the production of unidirectional recombinants at unusually high frequencies, from which a concordant maximum map distance of 1/10 Morgan unit can be derived. In consequence, the map becomes considerably lengthened if compared to the other site distances so far determined (Fig. 1).

Some ambiguities were however recorded with respect to the hypothesis adopted. In the model, w^{frA} is identical with w^{iv} . It should be separated from w^{ak} by 1/20 Morgan unit, and accordingly, recombination between the w^{ak} and the w^{frA} sites should produce each of the reciprocal exchange types at a frequency of 1/4,000. At variance with this estimate, several types were found in lower proportions, rather 1/8,000 than 1/4,000.

Crosses:	(12)	(14)	(16)
Model:	$ \begin{array}{ccccc} + & w^{frA} & & w^{frB} & \\ \cdots & & & & \cdots \\ & \times & & & \\ \cdots & & & & \cdots \\ w^{ak} & + & & + & \end{array} $	$ \begin{array}{ccccc} w^{ak} & w^{frA} & & w^{frB} & \\ \cdots & & & & \cdots \\ & \times & & & \\ \cdots & & & & \cdots \\ + & + & & + & \end{array} $	$ \begin{array}{ccccc} w^{ak} & w^{frA} & & w^{frB} & \\ \cdots & & & & \cdots \\ & \times & & & \\ \cdots & & & & \cdots \\ w^{sw1} & + & & + & \end{array} $

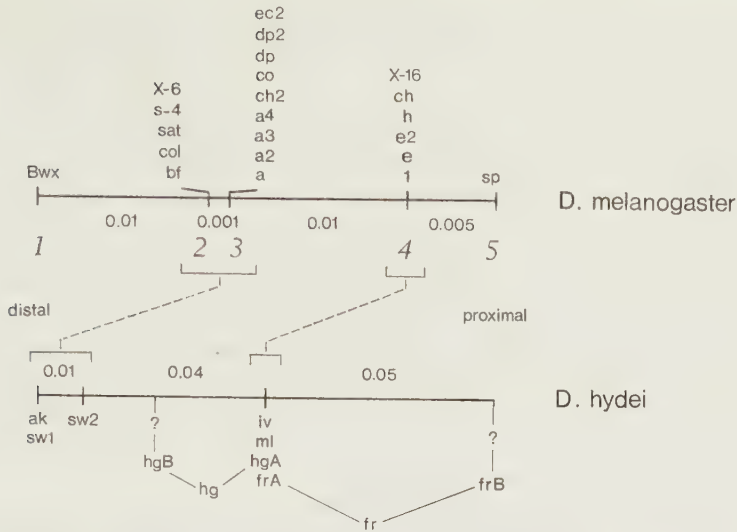


Fig. 1. Maps of the *white* loci in *D. melanogaster* and *D. hydei*. *D. melanogaster*: 5 subloci, (1–5), from Lindsley and Grell (1968). *D. hydei*: 3 subloci (*w^{ak}*, *w^{sw2}*, *w^{iv}*). The alleles *w^{hg}* and *w^{fr}* are assumed to contain two mutant components, the primary mutation (A) identical with *w^{iv}* and the secondary mutation (B) mapping outside of the *w^{iv}* sublocus. Possible sublocus homologies are indicated by dashed lines (see discussion in the text)

The following recombinant frequencies were recorded (cf. Tables 2 and 3): 4 white eyed R2-type recombinants among 40,000 offspring in cross (12), 2 *w^{ak}* and 3 *w^{fr}* recombinants as the reciprocal types in 25,000 offspring of cross (14), and 5 *w^{ak}* recombinants in 37,000 offspring of cross (16). To some extent, this shortage might be due to random fluctuations, but it is felt, that in the case of *w^{fr}* the mapping approach to estimate distances could have failed for other reasons. Hence, the localization of *w^{frB}* on the map remains tentative.

To summarize, there are indications—especially qualitative ones—that *w^{fr}* represents a double mutant, as explained by the model. The quantitative results suggest that the mutant might somehow interfere with regular homologous pairing and thereby with the realization of exchange.

Discussion

The purpose of this investigation was to obtain an insight into the genetic fine-structure of the *white* locus in *Drosophila hydei*. It was conjectured that a comparison with the known structure of this locus in *D. melanogaster* could inform us whether the homologous genes are similarly organized in the two species.

The experiments show that in *D. hydei* the seven available alleles are members of a pseudo-allelic series (Fig. 1). The formal concept of a complex *white* gene including several subloci, as demonstrated for *D. melanogaster* (Carlson, 1959; Green, 1959a; Judd, 1959), is acceptable for *D. hydei*, too: The mutation *w^{sw2}* and the putative accessory mutations *w^{hgB}* and *w^{frB}* in two derivatives of the *w^{iv}*

mutant were located at individual points on the locus map; four mutations, however, had pairwise coincident map positions (w^{ak} , w^{sw1} and w^{iv} , w^{ml}).

Genetic exchange within the *white* gene, between members of different subloci, was accompanied in prevalence by recombination of the flanking marker genes and associated with positive interference. Thus in agreement with the general findings in *D. melanogaster* (cf. Green, 1959a, but also consider Green, 1960), conversion-like events at the *white* locus did not become apparent, at least not conspicuously. On the other hand, conversion-like phenomena seem to be common in some other genes of *Drosophila* (Finnerty, Duck and Chovnick, 1970; Chovnick, Ballantyne and Holm, 1971; Carlson, 1971), although they are probably not typical of intragenic exchange at all the loci (reviews by Carlson, 1959; Green, 1965). It might depend on the gene-specific internal organization whether crossing-over-like or conversion-like exchanges are recovered preponderantly (cf. Chovnick, Ballantyne and Holm, 1971). Provided the criterion is valid in discriminating between categories of gene architecture, the *white* genes of *D. hydei* and *D. melanogaster* clearly belong to one and the same kind.

In comparison with *D. melanogaster*, the general incidence of recombination was high at the *white* locus of *D. hydei*. Although no interchromosomal effect could be used in this species to enhance recombination, the frequencies of some recombinant types point to a total map length of about 1/10 Morgan unit. In contrast, the total map in *D. melanogaster* spans 1/40 Morgan unit only. The figure mentioned for *D. hydei* might however not be strictly comparable to any concrete map distance in the reference species, because it is based on exchange experiments which involved the alleles w^{ak} and w^{fr} , the latter representing a putative double mutant which cannot be adequately put in line with a possibly homologous mutant of *D. melanogaster*. If only those four mutations of *D. hydei* are considered, which had arisen from wild type, a map distance of 1/20 Morgan unit obtains with accurate repeatability for the extreme subloci. The bulk of the *white* mutations of *D. melanogaster* are clustered on three subloci, denoted by the ciphers 2, 3 and 4 in Fig. 1 (Carlson, 1959; Judd, 1964; Lindsley and Grell, 1968). The approximate distance separating the clusters 2 and 3 from sublocus 4 has been estimated as 1/100 Morgan unit. Since there are no mutants in *D. hydei* corresponding to the more exceptional members of the subloci 1 and 5, it is reasonable to compare the distance of 1/20 Morgan unit in *D. hydei* to that of 1/100 Morgan unit in *D. melanogaster*. The latter estimate (Carlson, 1959) mainly relies upon the thorough analysis carried out by Green (1959a). On a rough average, Green found one *white*⁺ recombinant in 5,000–10,000 offspring, within a range of 1/4,000 to 1/50,000. Since interchromosomal effects were used to enhance recombination, a correction factor 1/2 to 1/5 seems appropriate in adjusting to the standard scale. Considering also that the *white*⁺ exceptions reflect but 50% of all the recombinants, the distance separating the subloci 2 and 3 from 4 could measure as much as 1/40 Morgan unit, but 1/100 Morgan unit is probably a more realistic estimate. Hence, the conclusion seems justified that recombination within the *white* gene is at least twice as frequent in *D. hydei* than in *D. melanogaster*. To explain this finding formally, it may be recalled that Spencer (1949) has found a similar situation in comparing the total map length of the X chromosomes in the two species. It is likely, therefore, that all crossover-type recombination occurs more frequently in *D. hydei*,

within the genes as well as between them. On account of this, we are not compelled to postulate that the *white* genes of the two species differ in physical expansion.

On the assumption that in both species the *white* gene has a complex structure of the same sort, comprising at least two functionally distinctive parts (Green, 1959a, 1969; Kalisch and Rasmuson, 1974; van Breugel, 1970), it is of interest to examine the *D. hydei* mutants from the point of view of sublocus homology. In *D. melanogaster*, the numerous recessive *white* mutations, which reduce pigmentation to various degrees but uniformly over the whole eye, are located in three unequally spaced subloci. The two distal positions appear as most intimately linked. The *white* mutations of *D. hydei* are spaced in a congruent way on the locus map (Fig. 1). This suggests the following sequential homology: subloci 2—3—4 (*D. melanogaster*) = subloci $w^{ak} - w^{sw2} - w^{iv}$ (*D. hydei*).

In *D. melanogaster*, secondary mutants are known which appear as partial revertants of primary *white* mutants. Three derivatives of the w^1 allele have been located in the proximal part of the gene, and probably represent homo-alleles of the original w^1 mutant (Green, 1959a, 1965). A parallel case was found in *D. hydei*. The derivative w^{ml} behaves as a homo-allele of the primary w^{iv} mutant. There were indications from two other derivatives of w^{iv} , that the secondary mutations do not necessarily involve the site of the first lesion. The "partial revertants" may represent double mutants with, on occasions, considerably spaced mutant components. All three derivatives, when compounded to the distally located w^{ak} mutant, gave rise to wild type recombinants, as did the original w^{iv} allele. One could argue, therefore, that the secondary mutations, which interact with the primary mutation in phenotypic expression, are locally restricted to one functional subunit, viz., to the proximal part of the gene in the cases under discussion.

Two of the derivatives of w^{iv} studied, were thought to be double mutants, mainly, because three different types of intragenic recombinants were obtained from the compounds with the hetero-allele w^{ak} . In each case, an exceptional exchange type was found which produced a white eye phenotype, but was not the reciprocal recombinant to the *white*⁺ exchange type. However, similar complications are known to occur in intragenic exchange at the *white* locus of *D. melanogaster*. The literature offers alternative explanations to the observed facts. In particular, it is possible that the exceptional white eyed recombinants obtained from w^{hg} do not carry a single site mutation (putative w^{hgB} in Fig. 1), but rather contain *white* deletions which originated from unequal exchange (cf. Green, 1959b, 1963). This view seems supported by the observation that the fluorescent pigment precursors are apparently lacking in the eyes of this exchange type (Frei, 1973). However, exceptional white eyed recombinants from w^{fr} do produce fluorescent substances. Thus, if they were due to *white* deletions, these would have to be partial losses. Or conversely, the mutant w^{fr} itself could have originated from unequal exchange, and hence constitute a submicroscopic duplication of the w^{iv} mutant gene. Recombination might then regularly bring back the hypomorphic w^{iv} mutant in its simple form. An assumption of the sort would at least offer an explanation why some recombinant types were unusually frequent, whereas other predicted types turned up at frequencies below expectation in progeny tests with w^{fr} (cf. Green, 1959c, 1966; Judd, 1964).

Whatever explanation is preferred, it seems clear that the new mutant alleles, derived from w^{iv} , are comparable in so far as they concern the proximal part of the *white* gene only.

Acknowledgements. I wish to thank Prof. H. J. Gloor for advice and stimulating discussions. I am grateful to Dr. F. M. A. van Breugel (Leiden) for the cytological contributions. Thanks are also due to Miss E. Pastors for technical assistance.

The investigation was supported by the Fonds National Suisse de la recherche scientifique grant No. 3.224.69.

References

- Breugel, F. M. A. van: An analysis of white-mottled mutants in *Drosophila hydei*, with observations on X-Y exchanges in the male. *Genetica* **41**, 589–625 (1970)
- Breugel, F. M. A. van, Ray, A., Gloor, H.: A comparison of banding patterns in salivary gland chromosomes of two species of *Drosophila*. *Genetica* **39**, 165–192 (1968)
- Carlson, E. A.: Comparative genetics of complex loci. *Quart. Rev. Biol.* **34**, 33–67 (1959)
- Carlson, P. S.: A genetic analysis of the rudimentary locus of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res. (Camb.)* **17**, 53–81 (1971)
- Chovnick, A., Ballantyne, G. H., Holm, D. G.: Studies on gene conversion and its relationship to linked exchange in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **69**, 179–209 (1971)
- Clausen, R. E.: Inheritance in *Drosophila hydei*. I. *white* and *vermillion* eye colors. *Amer. Natur.* **57**, 52–58 (1923)
- Finnerty, V. G., Duck, P., Chovnick, A.: Studies on genetic organization in higher organisms. II. Complementation and fine structure of the *maroon-like* locus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **65**, 939–946 (1970)
- Frei, H.: New *white* alleles by recombination in *Drosophila hydei*. *Drosophila Information Service* **50**, 165–166 (1973)
- Frei, H.: Unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit in der Spermatogenese von *Drosophila hydei*, Letalraten und die Bedeutung der arteigenen genetischen Organisation. *Archiv für Genetik* **47**, 136–171 (1974)
- Green, M. M.: Spatial and functional properties of pseudo-alleles at the *white* locus in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **13**, 303–315 (1959a)
- Green, M. M.: Putative non-reciprocal crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Z. Vererbungsl.* **90**, 375–384 (1959b)
- Green, M. M.: Non-homologous pairing and crossing over in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **44**, 1243–1256 (1959c)
- Green, M. M.: Double crossing over or gene conversion at the *white* loci in *Drosophila melanogaster*? *Genetics* **45**, 15–18 (1960)
- Green, M. M.: Unequal crossing over and the genetical organization of the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *Z. Vererbungsl.* **94**, 200–214 (1963)
- Green, M. M.: Genetic fine structure in *Drosophila*. In: *Genetics today* (Proc. XIth Int. Congr. Genet., The Hague 1963; Geerts, S. J., ed.), vol. 2, p. 37–49. Oxford: Pergamon Press 1965
- Green, M. M.: Polarized pairing and recombination in tandem duplications of the *white* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **54**, 881–885 (1966)
- Green, M. M.: Controlling element mediated transpositions of the *white* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **61**, 429–441 (1969)
- Gregg, T. G.: The production of attached-X chromosomes in *Drosophila hydei*. *Univ. Texas Publ.* **5721**, 238–245 (1957)
- Judd, B. H.: Studies on some position pseudo-alleles at the *white* region in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **44**, 34–42 (1959)
- Judd, B. H.: The structure of intralocus duplication and deficiency chromosomes produced by recombination in *Drosophila melanogaster*, with evidence for polarized pairing. *Genetics* **49**, 253–265 (1964)
- Kalisch, W.-E., Rasmuson, B.: Changes of *zeste* phenotype induced by autosomal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas (Lund)* **78**, 97–104 (1974)

- Kobel, H. R., Gloor, H.: *Drosophila* species: new mutants, *D. hydei*. Report of H. Gloor. *Drosophila* Information Service **47**, 47-52 (1971)
- Lindsley, D. L., Grell, E. H.: Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Wash. Publ. **627** (1968)
- Spencer, W. P.: Gene homologies and the mutants of *Drosophila hydei*. In: Genetics, paleontology, and evolution (Jepsen, G. L., Mayr, E., Simpson, G. G., eds.), p. 23-44. Princeton N.J.: Princeton University Press 1949
- Spencer, W. P.: Genetic studies on *Drosophila mulleri*. II. Linkage maps of the X and chromosome II with special reference to gene and chromosome homologies. Univ. Texas Publ. **5721**, 206-217 (1957)
- Wassermann, M.: Cytological studies of the *repleta* group. Univ. Texas Publ. **5422**, 130-152 (1954)
- Wasserman, M.: Cytological studies of the *repleta* group of the genus *Drosophila*. IV. The *hydei* subgroup. Univ. Texas Publ. **6205**, 73-83 (1962a)—V. The *mulleri* subgroup. *Idem*, 85-117 (1962b)

Communicated by E. Hadorn

Hansjörg Frei
Laboratoire de Génétique animale et végétale
Université de Genève
154, route de Malagnou
CH-1224 Chêne-Bougeries/Genève
Switzerland

